

Aus der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Ulm

Leiter: Prof. Dr. H. Bader

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. H. U. Wolf

Vorgelegt über Prof. Dr. A. Schmid

# **EIGENSCHAFTEN DER $Ca^{2+}$ -TRANSPORT-ATPASE DER HUMANERYTHROCYTEN NACH GEZIELTER SPALTUNG MIT EINIGEN PROTEASEN**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Birgit Klus  
aus  
München

München 1985



Aus der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Ulm  
Leiter: Prof. Dr. H. Bader  
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. H. U. Wolf  
Vorgelegt über Prof. Dr. A. Schmid

EIGENSCHAFTEN DER  $Ca^{2+}$ -TRANSPORT-ATPASE DER  
HUMANERYTHROCYTEN NACH GEZIELTER SPALTUNG MIT  
EINIGEN PROTEASEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Birgit Klus  
aus  
München

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| Dekan:       | Prof. Dr. W. Leidl        |
| Referent:    | Prof. Dr. A. Schmid       |
| Korreferent: | Prof. Dr. H. P. Jennissen |

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Abkürzungen

nach Inhaltsverzeichnis

|     |                                                                               |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| I   | <u>EINLEITUNG</u>                                                             | 1  |
| II  | <u>LITERATUR</u>                                                              | 2  |
| 1   | <u>Die <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Transport-ATPase der Humanerythrocyten</u> | 2  |
| 1.1 | Aufgabe in der Membran und Mechanismus des $\text{Ca}^{2+}$ -Transports       | 2  |
| 1.2 | Zur Reinigung der $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase der Humanerythrocyten    | 5  |
| 1.3 | Molekulargewicht und Art und Anzahl der Aminosäuren                           | 7  |
| 2   | <u>Die Aktivitätssteigerung einiger CaM-abhängiger Enzyme</u>                 | 9  |
| 2.1 | Durch eine Proteolyse                                                         | 9  |
| 2.2 | Durch eine Aktivierung mit Phospholipiden und Fettsäuren                      | 15 |
| 3   | <u>Calmodulin</u>                                                             | 17 |
| 4   | <u>Proteasen</u>                                                              | 20 |
| 4.1 | Ihre physiologische Bedeutung                                                 | 20 |
| 4.2 | Chemischer Vorgang der Proteolyse                                             | 20 |

|                                                                                     |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 4.3 Einteilung der Proteasen                                                        | 21     |
| 4.3.1 Einteilung nach der Wirkung im Organismus                                     | 21     |
| 4.3.2 Einteilung nach spezifischen Eigenschaften                                    | 22     |
| 4.4 Anwendungsmöglichkeiten der Proteasen                                           | 22     |
| 4.4.1 Zur Aminosäureanalyse und Aminosäuresequenzanalyse                            | 22     |
| 4.4.2 Zur Untersuchung von Enzymen                                                  | 23     |
| 4.5 Einige spezifische Eigenschaften der bei den Versuchen<br>verwendeten Proteasen | 23     |
| <br>III <u>EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>                                                | <br>29 |
| 1 <u>Materialien</u>                                                                | 29     |
| 2 <u>Allgemeine Methoden</u>                                                        | 30     |
| 2.1 Aktivitätsbestimmung                                                            | 30     |
| 2.2 Proteingehaltsbestimmung                                                        | 32     |
| 2.3 Calmodulin                                                                      | 32     |
| 2.3.1 Präparation von Calmodulin                                                    | 32     |
| 2.3.2 Herstellung des Calmodulin-Affinity-Gels                                      | 36     |
| 2.4 Desoxycholsäurereinigung                                                        | 37     |
| 2.5 Phosphatidylcholinherstellung                                                   | 38     |

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6 Methoden zur Isolierung der gereinigten<br>Ca <sup>2+</sup> -Transport-ATPase             | 38 |
| 2.6.1 Präparation des membrangebundenen Enzyms                                                | 38 |
| 2.6.2 Solubilisierungs- und Reinigungsschritte bei<br>der Präparation                         | 40 |
| 2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                                           | 43 |
| 2.8 Bestimmung der spezifischen Aktivität und des<br>Aktivitätsverlustes während der Versuche | 43 |
| 3 <u>Spezielle Methoden und Versuchsauswertung</u>                                            | 44 |
| 3.1 Stabilität des Enzyms während der Messungen                                               | 44 |
| 3.2 Lösen der verwendeten Proteasen                                                           | 45 |
| 3.2.1 Verwendete Puffer                                                                       | 45 |
| 3.2.2 Eingesetzte Aktivatoren und Stabilisatoren bei<br>den untersuchten Proteasen            | 46 |
| 3.3 Einfluß einer hohen DTT-Konzentration auf die<br>spezifische Aktivität des Enzyms         | 47 |
| 3.4 Durchführung der Proteolyse                                                               | 47 |
| 3.4.1 Methodischer Aufbau                                                                     | 47 |
| 3.4.2 Messung der verbliebenen Aktivität des Enzyms<br>nach der Proteolyse                    | 47 |

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.3 Beenden der Proteolyse nach einer bestimmten<br>Zeit                              | 48 |
| 3.5 Berechnung des Aktivitätsverlustes der<br>Proteasen während der Versuche            | 48 |
| 3.6 Einfluß von CaM auf die Proteolyse                                                  | 49 |
| 3.7 Korrektur der gemessenen Werte                                                      | 51 |
| 3.8 Beurteilung der gemessenen Werte mit einem ent-<br>sprechenden Gelelektropherogramm | 51 |
| 4 <u>Ergebnisse</u>                                                                     | 54 |
| 4.1 Stabilität des Enzyms und der eingesetzten<br>Proteasen während der Versuche        | 54 |
| 4.2 Ergebnisse der zeitlich begrenzten,<br>konzentrationsabhängigen Proteolyse          | 57 |
| 4.2.1 Trypsin                                                                           | 57 |
| 4.2.2 $\alpha$ -Chymotrypsin                                                            | 60 |
| 4.2.3 Thermolysin                                                                       | 60 |
| 4.2.4 Papain                                                                            | 63 |
| 4.2.5 Nagarse                                                                           | 67 |
| 4.2.6 Ficin                                                                             | 67 |
| 4.3 Der Einfluß von Calmodulin auf das proteolytisch<br>gespaltene Enzym                | 70 |

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4 Vergleich der Gelelektropherogramme mit den entsprechenden Messungen | 73  |
| 4.4.1 Trypsin                                                            | 73  |
| 4.4.2 $\alpha$ -Chymotrypsin                                             | 75  |
| 4.4.3 Thermolysin                                                        | 79  |
| 4.4.4 Papain                                                             | 83  |
| 4.4.5 Nagarse                                                            | 88  |
| 4.4.6 Ficin                                                              | 88  |
| IV <u>DISKUSSION</u>                                                     | 94  |
| V <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>                                                 | 102 |
| Summary                                                                  | 104 |
| VI <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>                                           | 106 |
| Lebenslauf                                                               | 122 |
| Danksagung                                                               | 123 |

## VERZEICHNIS DER VERWENDETEN SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

### S y m b o l e

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| ( )   | Konzentration                      |
| E     | Enzym                              |
| $k_m$ | Michaelis Menten Konstante         |
| v/v   | Volumen / Volumen                  |
| w/v   | Gewicht / Volumen                  |
| IOV   | Inside-out-vesicle                 |
| U     | Einheit, Definition siehe Seite 36 |

### A b k ü r z u n g e n

|                          |                                                                 |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| ADP                      | Adenosin-5'-diphosphat                                          |
| ATP                      | Adenosin-5'-triphosphat                                         |
| $\gamma$ - $^{32}$ P-ATP | in $\gamma$ -Stellung mit $^{32}$ P <sub>i</sub> markiertes ATP |
| ATPase                   | Adenosintriphosphatase                                          |
| CaM                      | Calmodulin                                                      |
| CaT                      | Ca <sup>2+</sup> -Transport-ATPase                              |
| DFP                      | Diisopropylfluorophosphat                                       |
| DOC                      | Desoxycholsäure                                                 |
| DTT                      | Dithiothreitol                                                  |
| EDTA                     | Ethylendiamintetraessigsäure                                    |
| EGTA                     | Ethylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessig-<br>säure           |
| GMP                      | Guaninmonophosphat                                              |
| LiDS                     | Lithiumdodecylsulfat                                            |
| ME                       | Mercaptoethanol                                                 |
| MOPS                     | N-Morpholinopropansulfonsäure                                   |
| PC                       | Phosphatidylcholin                                              |
| P <sub>i</sub>           | anorganisches Phosphat                                          |
| PS                       | Phosphatidylserin                                               |
| SDS                      | Natriumdodecylsulfat                                            |
| TCA                      | Trichloressigsäure                                              |
| TLCK                     | Na-p-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon                             |
| Tris                     | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                |



I

EINLEITUNG

Nach LOEWENSTEIN und ROSE (1978) führt eine unphysiologische intrazelluläre Calciumkonzentration zur Auflösung des Zellverbandes, einer Schwellung der Mitochondrien und schließlichem Zelltod. Es ist deshalb lebenswichtig, daß eine optimale Calciumkonzentration auf zellulärer Ebene permanent aufrecht erhalten wird, und es liegt nahe, daß dafür ein physiologischer Regelmechanismus vorhanden ist.

Für den Transport des Calciums wurde eine ATPase verantwortlich gemacht. Dabei (ATPase) handelt es sich um eine Enzymaktivität, die auch von anderen transport- und engergietransduzierenden Proteinen aufgewiesen wird, von welchen inzwischen die Myosin-ATPase die Dynein-ATPase, die  $H^+$ -Transport-ATPase, die  $H^+$ -Transport-ATP-Synthase, die  $H^+/K^+$ -Transport-ATPase, die  $Na^+/K^+$ -Transport-ATPase ("Natrium-Kalium-Pumpe"), die Thymidin-Triphosphatase und die  $Ca^{2+}$ -Transport-ATPase in der Plasmamembran von Eukaryonten (und Prokaryonten?) differenziert wurden.

Die  $Ca^{2+}$ -Transport-ATPase der Plasmamembran repräsentiert den wesentlichen Regelmechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Calciumhomöostase, d.h. die sogenannte "Calciumpumpe". Sie unterscheidet sich von einem vergleichbaren Calcium-Transport-Enzym im sarkoplasmatischen Retikulum durch ihre Aktivierbarkeit mit Calmodulin, ihre Hemmbarkeit mit Vanadat und ein höheres Molekulargewicht.

Zur weiteren Charakterisierung der Calciumpumpe ist die  $Ca^{2+}$ -Transport-ATPase von menschlichen Erythrocyten (als Modellenzym) einem Partialabbau mit verschiedenen Proteasen (Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin, Papain, Thermolysin, Nagarse und Ficin) unterworfen und die Calcium-Transport-Aktivität der Spaltprodukte untersucht worden.

## II LITERATUR

### 1 Die $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase der Humanerythrocyten

#### 1.1 Aufgabe in der Membran und Mechanismus des $\text{Ca}^{2+}$ -Transports

Wie schon in der Einleitung erwähnt, spielt ein niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt für die richtige Funktion der Erythrocyten eine entscheidende Rolle. Im extrazellulären Raum liegt der freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt bei etwa 1,5 mmol/l, während er in der Zelle bei etwa 0,1  $\mu\text{mol/l}$  liegt. Calcium diffundiert permanent in die Zelle, ein Teil dieses Calciums kann zeitweise durch Puffersysteme und durch anionische, nicht membranöse Liganden gebunden werden (WESTHEIMER, 1980), wobei vermutlich Calmodulin am meisten bindet.

Um den für die Funktion der Zelle notwendigen niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt aufrechtzuerhalten, ist daher die Arbeit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase (CaT) notwendig (CARAFOLI et al., 1982). In erster Linie ist sie für die Erythrocyten wichtig, da sie im Gegensatz zu anderen Zellen kein ausreichendes, funktionstüchtiges Austauschsystem haben.

Allgemein gilt für  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen (SARKADI et al., 1982):

1. Sie haben eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität
2. Sie werden von Vanadat gehemmt
3. Sie werden durch CaM stimuliert
4. Sie liegen in der Plasmamembran (PENNISTON, 1982)
5. Sie benötigen für ihre Funktion geringe Mengen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$

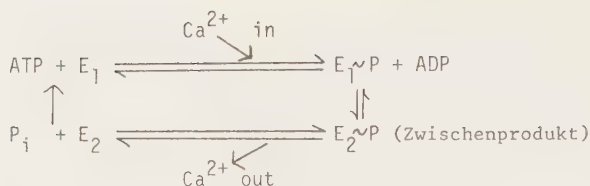
Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport aus den Humanerythrocyten sind folgende Kriterien wichtig (SARKADI et al., 1982):

1. Regulation durch CaM
2. Vorhandensein von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wodurch erst der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport stimuliert werden kann
3. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Bildung eines phosphorylierten Zwischenprodukts (PENNISTON, 1982), -Phosphoenzym-

Bei niedrigem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ist Calmodulin nicht, wie von VINCENZI & HINDS (1981) beschrieben, an das Enzym gebunden, sondern liegt ungebunden im Zytoplasma.

Die Aktivierung des Transportes durch CaM ist auch an Inside-out-Vesikeln gesichert (LUTHRA et al., 1980). Die Angaben zum Molekulargewicht der CaT schwanken zwischen 130 000 (NIGGLI et al., 1969; LUTHRA et al., 1980) und 140 000 bis 150 000 Dalton (KNAUF et al., 1974; WOLF et al., 1977; ENYEDI et al., 1980), wobei die letzte Angabe dem wahren Molekulargewicht entspricht. LUTHRA et al. (1980) geben zwar an, daß eine durch CaM stimulierte Einlagerung von ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP hauptsächlich in das 130 000 Dalton Enzym erfolgt. Diese Differenzen in der Angabe des Molekulargewichts dürften aber analytischer oder methodischer Natur sein.

Das folgende Schema gibt den möglichen Reaktionsmechanismus der Funktionsweise der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase wieder.



Schema 1: Schematische Darstellung der Bildung des acylphosphorylierten Zwischenprodukts (KNAUF et al., 1974) bzw. des  $\text{Mg}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports (CARAFOLI & ZURINI, 1982).

Vermutlich gilt dieses Schema auch für andere ATPasen aus Plasmamembranen (CARAFOLI & ZURINI, 1982).

Für den Ionentransport benötigt die CaT der Humanerythrocyten, sowie auch andere ATPasen, die Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen (MEANS & DEDMAN, 1980). Unter Spaltung von ATP und der Phosphorylierung des Enzyms (als Aspartylphosphat =  $\text{E}_1 \sim \text{P}$ ) wird der aktive Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über die Membran eingeleitet (CARAFOLI & ZURINI, 1982). Zu diesem Zeitpunkt ist die Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen noch nicht erforderlich (REGA & GARRAHAN, 1975). Während des Transports existiert das Enzym vermutlich in zwei verschiedenen Zuständen, nämlich als  $\text{E}_1$  und  $\text{E}_2$ , welche zwei verschiedene Konformationszustände repräsentieren. Das Phosphat wird an das Enzym ( $\text{E}_1 \sim \text{P}$ ) angelagert, die Reaktion läuft dann rasch über  $\text{E}_2 \sim \text{P}$  (in Anwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen) in Richtung  $\text{P}_i + \text{E}_2$  weiter, wobei bei der Spaltung von  $\text{E}_2 \sim \text{P}$  zu  $\text{E}_2 + \text{P}_i$  Energie frei wird.

## 1.2

### Zur Reinigung der CaT der Humanerythrocyten

Obwohl man vom Vorhandensein einer CaT in den Humanerythrocyten schon lange wußte, war es lange Zeit nicht möglich, sie in reiner Form darzustellen. Vom Gesamtprotein der Erythrocyten macht sie nämlich nur ca. 0,2 % aus. Dies konnten KNAUF et al. (1974) mit radioaktiv markiertem Phosphor, als ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) - ATP nachweisen. Bei einer Reinigung von Inside-out-Vesikeln (IOV) erscheint das Enzym in Bande III gemeinsam mit einem Enzym, das einen wesentlich größeren Anteil ausmacht (KNAUF et al., 1974). Neben der geringen Ausbeute war das Enzym zusätzlich noch sehr instabil ohne seine natürliche Umgebung von Phospholipiden und gewissen Detergentien (SCHATZMANN, 1982). Wolf und Mitarbeitern (WOLF & KNIPSER, 1975; WOLF & DIECKVOSS, 1976; LICHTNER & WOLF, 1977; WOLF et al., 1977) gelang es als erste, mit Gelchromatographie das  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpende Enzym in reinem Zustand darzustellen. Sie solubilisierten die Erythrocytenmembranen in 0,2 % Triton-X-100 und brachten den Überstand auf eine Sepharose CL 6B-Säule, die zuvor mit einem Puffer, der Lecithin und Tween 20 enthielt, äquilibriert worden war. Mit einem Puffer, der die gleiche Lipid-Detergensenkonzentration enthielt, konnten sie dann das Protein von der Säule waschen, das an "mixed micelles" aus Lecithin und Tween 20 gebunden war.

In den Gelelektropherogrammen des eluierten Proteins wiesen sie 3 Banden nach, deren Molekulargewichte bei 145 000, 115 000 und 105 000 Dalton lagen, wobei nur die Bande bei 145 000 Dalton die charakteristische  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phosphorylierung zeigte.

Erst nachdem es dann 1977 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gelang, einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aktivator (CaM) erfolgreich zur Aktivierung von Erythrocytenghosts einzusetzen (GOPINATH & VINCENZI, 1977; JARRET & PENNISTON, 1977 und 1978), war der entscheidende Durchbruch zur Reinigung des Enzyms gelungen.

Entsprechend einer Methode von WATTERSON & VANAMAN (1976), die die CaM-abhängige Phosphodiesterase über ein Calmodulin-Sepharosegel reinigten, wurde eine Reinigung der CaT vorgenommen. Der Nachweis, daß Calmodulin direkt mit dem Enzym reagiert, und hier nicht ein membrangebundener Faktor oder ionenabhängiger Einfluß eine Rolle spielt, konnte an einem mit Triton-X-100 solubilisiertem Enzym gezeigt werden (LYNCH & CHEUNG, 1979; PENNISTON, 1982).

Die erste wirklich erfolgreiche Reinigung gelang NIGGLI et al. (1979) mit einer CaM-Affinitysäule. Diese Säule wurde mit Erythrocytenghosts beladen, die zuvor mit Triton-X-100 solubilisiert und durch Waschen mit einem EDTA-enthaltenden Puffer von Calmodulin befreit worden war.

Um die CaT in ihrem aktivierten Zustand zu erhalten, wurde dem Detergens, dem Säulenmaterial und dem Elutionspuffer das Phospholipid Phosphatidylserin zugesetzt. Zunächst wurde mit einem EDTA-enthaltenden Puffer das Gel nachgewaschen, dabei erschien etwa 99 % des aufgetragenen Proteins als Bande III, welches als  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase identifiziert werden konnte, ein Enzym, das  $\text{Mg}^{2+}$  benötigt, aber keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Anschließend wurde der wesentlich geringere Proteinanteil mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -enthaltenden Puffer eluiert. Dieser zeigte dann die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivität. Die Methode von NIGGLI et al. (1979), bei der das eluierte Enzym eine spezifische Aktivität von 1.5 - 6  $\mu\text{mol}$  hydroly-

siertem ATP pro mg Protein und Minute hatte, konnte von GRAF et al. (1982) verbessert werden, wobei eine spezifische Aktivität von 15 - 20  $\mu$ mol ATP pro mg Protein und Minute erzielt werden konnte. Die Methode der Reinigung mit Phosphatidylserin und Triton-X-100 hat den Nachteil, daß das Enzym durch CaM nicht mehr aktivierbar ist.

GIETZEN et al. (1980) modifizierten die Methode dahingehend, daß DOC anstatt Triton-X-100 zur Solubilisierung, und Phosphatidylcholin anstelle von Phosphatidylserin verwendet wurden, wodurch das so gereinigte Enzym dann durch CaM aktivierbar war. Außerdem konnten GIETZEN & KOLANDT (1982) den ganzen Reinigungsprozeß verkürzen, indem das Hämoglobin und andere lösliche Proteine nicht durch Zentrifugation, sondern mit einer Molekularfiltration abgetrennt wurden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß eine wesentlich größere Ausgangsmenge Blut eingesetzt werden kann, eine höhere Ausbeute und eine um 50 bis 60 % höhere Aktivität erzielt werden kann.

### 1.3 Molekulargewicht und Art und Anzahl der Aminosäuren

Mit der unter (II/1.2) beschriebenen Reinigungsmethode war es nun auch möglich, das Molekulargewicht mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese exakt zu bestimmen. Folgende Molekulargewichte werden in der Literatur angegeben: 138 000 (NIGGLI et al., 1979), 140 000 bis 150 000 Dalton (GIETZEN, 1980). Bei ca. 95 000 Dalton erscheint gelegentlich noch eine Bande, vermutlich ein Rest der Bande III, die durch längeres Nachwaschen mit dem EDTA-Puffer verschwindet (NIGGLI et al., 1979).

Eine weitere Bande bei 200 000 Dalton wird beobachtet, die unter verschiedenen Bedingungen stärker wird (Gefriertrocknen und längere Aufbewahrung bei -196 °C) (RONNER et al., 1977). Hier handelt es sich unter Umständen um ein Dimer der CaT, das in SDS nicht dissoziiert und vermutlich während der Präparation entsteht; ein Nachweis dafür konnte mit radioaktiv markiertem ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP erbracht werden (CARAFOLI & ZURINI, 1982).

Die Art und Anzahl der Aminosäuren der CaT wird, bei einem Molekulargewicht von 138 000 Dalton, von GRAF et al. (1982) wie folgt angegeben:

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Lys | 84  | Ala | 81  |
| His | 22  | Cys | 20  |
| Arg | 56  | Val | 97  |
| Asp | 131 | Met | 29  |
| Thr | 73  | Ile | 83  |
| Ser | 85  | Tyr | 26  |
| Glu | 134 | Phe | 49  |
| Pro | 62  | Trp | 7   |
| Gly | 95  | Leu | 115 |

Aufgrund des mittleren "Hydrophobicity-Index" liegt nach ihrer Meinung die CaT der Humanerythrocyten genau an der Grenze zwischen integralen und peripheren Membranproteinen.

2 Die Aktivitätssteigerung einiger CaM-abhängiger Enzyme

2.1 Durch eine Proteolyse

Eine begrenzte proteolytische Verdauung wurde in letzter Zeit benutzt, um den Mechanismus eines Enzyms besser zu verstehen.

RAY & SEN (1981) zeigten, daß die  $K^+$  stimulierte ATPase aus Microsomen des Magens nach leichter Proteolyse mit Trypsin die Bindungsstelle für den Aktivator verliert, wobei jedoch der Bedarf an  $Mg^{2+}$ -Ionen und  $Ca^{2+}$ -Ionen keiner Veränderung unterliegt, allerdings aber eine  $Ca^{2+}$ -abhängige ATPase in Erscheinung tritt. Dieser Verlust der CaM-Sensitivität durch leichte Proteolyse mit Trypsin wurde noch für einige andere CaM-abhängige Enzyme gefunden. Dies gilt unter anderem für eine Phosphorylase-Kinase (COHEN, 1973), eine Myosin light chain Kinase (TANAKA et al., 1980) und eine Phosphodiesterase (CHEUNG, 1971).

In der auf der nächsten Seite gezeigten Tabelle sind CaM-abhängige Enzyme, die durch Proteolyse aktiviert werden, zusammengefaßt.

Tab. 1: Calmodulin abhängige Enzyme, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden (nach MEIJER & GUERRIER, 1982).

| Enzym                                                          | Gewebe                                                                         |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| light chain Myosinkinase                                       | Skelettmuskel (Kaninchen)<br>Körnermagen (Huhn)                                |
| cycl. Nucleotid Phosphodiesterase                              | Rinderhirn<br>Niere und Leber (Ratte)                                          |
| Phosphorylasekinase<br>$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase | Skelettmuskel (Kaninchen)<br>Humanerythrocyten<br>sarkoplasmatisches Reticulum |
| $\text{NAD}^{+}$ -Kinase                                       | Seeigeleier                                                                    |

MOSS et al. (1978) gelang der Effekt der Aktivierung durch Proteolyse mit Chymotrypsin mit der cyclischen GMP-Phosphodiesterase aus Rattenleber. Sie wird ebenfalls durch einen Aktivator (Calmodulin), präpariert aus Hirn und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, aktiviert. Eine Aktivierung um den Faktor 10 konnte durch CaM, und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowie auch durch Chymotrypsin erreicht werden. Die Wirkung des Chymotrypsins ist konzentrations- und zeitabhängig. Nach Einwirken dieser Protease konnte mit Calmodulingabe keine Aktivierung des Enzyms mehr erreicht werden.

Die  $\text{NAD}^{+}$ -Kinase aus Seeigeleiern konnte ebenfalls durch leichte Proteolyse mit Trypsin (MEIJER & GUERRIER, 1982) ähnlich aktiviert werden wie durch CaM, die Aktivierung war konzentrationsabhängig, aber nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Die Aktivierung erreichte durch Proteolyse nur 80 - 85 % gegenüber der durch CaM.

Die CaT des sarkoplasmatischen Reticulums wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen (MacLENNAN et al., 1976;

KLIP et al., 1980; MICHALEK et al., 1980) hinsichtlich der Spaltprodukte durch leichte Proteolyse untersucht. Eine kurze Einwirkdauer von Trypsin (1 Minute) und Abstoppen mit Inhibitor führten zu einer Spaltung in zwei Bruchstücke ( $100\ 000 \longrightarrow 55\ 000$  und  $45\ 000$  Dalton); dabei zeigte sich nach Einbau des nicht gespaltenen Enzyms und der Bruchstücke in Phospholipide, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport für das native Enzym  $440\ \text{nmol}$  und für das gespaltene  $270\ \text{nmol}$  pro Minute und  $\text{mg}$  Protein betrug (MacLENNAN et al., 1976). Eine länger dauernde Proteolyse führte zu kleineren Peptiden (MICHALEK et al., 1980), deren Reihenfolge in der Kette auch im Hinblick auf ihre Funktion beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport bzw. bei der ATP-Spaltung charakterisiert werden konnte (KLIP et al., 1980)

Eine Aktivierung der CaT der Humanerythrocyten durch Proteolyse wurde ebenfalls nachgewiesen. TAVERNA & HANAHAN (1980) zeigten, daß CaM-freie Erythrocytenmembranen durch eine leichte Trypsinbehandlung so aktiviert werden, als ob CaM, präpariert aus Rinderhirn, zugefügt wurde. Auch sie vermuteten schon einen direkten Effekt der Protease am Enzym. Ein ähnlicher Effekt wird auch für Chymotrypsin erwähnt. Durch Einwirken von Phospholipase  $\text{A}_2$  auf die CaT konnten sie eine ATP-Hydrolyse nachweisen, die durch CaM noch gesteigert werden konnte. Den direkten Effekt am Enzym durch Trypsin konnten ENYEDI et al. (1980) und SARKADI et al. (1980) bestätigen; die Aktivierung betrug annähernd  $100\ \%$ . Sie verwendeten Inside-out-Vesikel der Erythrocytenmembran und zeigten, daß sich das Molekulargewicht um ca.  $30\ 000$  Dalton bei Trypsinspaltung des Enzyms ( $150\ 000$  Dalton) verringerte. Durch die Spaltung des Enzyms, das durch ATP unter Einfluß von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen rasch phosphoryliert wird, erhöht sich sowohl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport als auch die Aktivität

(STIEGER & SCHATZMANN, 1981). Mit der proteolytischen Spaltung verschwindet auch die von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängige Bindung des CaM (SARKADI et al., 1980). ENYEDI et al. (1980) vermuteten schon, daß mit der Proteolyse die CaM-bindende Untereinheit an der Innenseite der Membran abgespalten wird. SARKADI et al. (1980) erwähnen auch einen ähnlichen Effekt für Papain.

Für das abgespaltene Polypeptid (30 000 Dalton) gilt nach ENYEDI et al. (1980) und SARKADI et al. (1980):

1. Es enthält die CaM-Bindungsstelle
2. Es reduziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität oder wirkt inhibitorisch
3. Es verliert die hemmende Wirkung in Anwesenheit von CaM.

Die  $\text{Mg}^{2+}$ -Affinität bleibt nach Trypsinspaltung erhalten. Der Zusatz an  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zum Enzym hat allerdings eine Verschiebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivitätskurve zur Folge (STIEGER & SCHATZMANN, 1981). Diese Autoren untersuchten die CaT in dem Zustand wie sie von der CaM-Affinity-Säule ( $\text{Ca}^{2+}$ -arm, CaM-frei) eluiert worden war, wobei sie auch eine Korrelation zwischen Enzymaktivität und Grad der Proteolyse zeigen konnten. Es wurde die Proteolyse an CaM-aktiviertem und nicht aktiviertem Enzym untersucht. Die maximale Aktivität wurde sowohl für das CaM-aktivierte als auch für das CaM-freie, nicht aktivierte Enzym durch Proteolyse in gleichem Maße erreicht. Dabei zeigte sich, daß bei optimaler Proteolyse mit Trypsin die Affinität des reinen Enzyms für  $\text{Ca}^{2+}$  höher liegt als bei optimaler Konzentration an CaM ( $K_m = 0,85 \mu\text{mol/l}$  im Vergleich zu  $1,66 \mu\text{mol/l}$ ); durch die Proteolyse zeigte sich eine optimale Aktivierung, entsprechend der durch CaM, wobei durch eine Zugabe von CaM nach der Proteolyse

keine weitere Aktivierung erzielt werden konnte. Normalerweise führt CaM zu einer Steigerung der Aktivität um den Faktor 5. Eine Proteolyse von 3 Minuten (Abstoppen mit Inhibitor) führte beim nicht aktivierten Enzym zu einem Plateau bei einer Konzentration von 10 - 15  $\mu\text{g}$  Trypsin pro ml Enzym, der halbmaximale Effekt lag bei 2.5 - 3.5  $\mu\text{g}$  pro ml Enzym. Beim aktivierten Enzym konnte im Bereich von 0 - 1  $\mu\text{g}$  pro ml Enzym eine leichte Aktivierung gezeigt werden. Die Proteolyse bedingt nicht nur eine Aktivierung des Enzyms, sondern auch eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports. STIEGER & SCHATZMANN (1981) wiesen weiterhin nach, daß das Enzym selbst eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität hat, und nach der Spaltung diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle am 100 000 Dalton-Bruchstück bleibt. Deshalb nehmen sie an, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die das CaM binden, nicht diejenigen sind, die durch die Membran transportiert werden. Im Gelelektropherogramm konnten sie zwei Bruchstücke, und zwar mit 95 000 - 100 000 Dalton und mit 35 000 - 40 000 Dalton zeigen. Sie vermuteten, wie auch bereits ENYEDI et al. (1980) und SARKADI et al. (1980), daß die CaM-Bindungsstelle an dem Bruchstück mit dem niedrigeren Molekulargewicht zu finden sei. Die Aktivierung des Enzyms durch CaM ist ziemlich sicher nicht mit einer Konformationsänderung verbunden (STIEGER & SCHATZMANN, 1981). Die veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität konnte auch von SARKADI et al. (1980) durch einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport nachgewiesen werden.

Eine genauere Untersuchung der Peptide, die bei der kontrollierten Proteolyse der CaT mit Trypsin auftreten, wurde dann von einigen Arbeitsgruppen um CARAFOLI (CARAFOLI et al., 1982; GRAF et al., 1982) durchgeführt, wobei auch die Aktivierbarkeit mit CaM näher untersucht wurde. Bei einer Einwirkdauer des Trypsins von 1.5 Minuten (1  $\mu\text{g}$  Trypsin pro 7.5  $\mu\text{g}$  Enzym) ent-

standen Bruchstücke zwischen 14 000 und 124 000 Dalton (CARAFOLI et al., 1982). Die Aktivierung des Enzyms durch diese leichte Proteolyse war nur gering, durch CaM konnte allerdings noch eine volle Aktivierung erreicht werden. Die Molekulargewichte dieser Bruchstücke betrugen 14 000, 35 000, 76 000 bis 81 000 und 90 000 Dalton. Am Zeitpunkt, an dem das Enzym durch Proteolyse (Proteolysezeit: 4 - 6 Minuten) voll aktiviert vorlag, zeigte sich dann der Verlust der Aktivierbarkeit durch CaM. Dieser war auch mit einem Wegfall der Bande bei 90 000 Dalton verbunden. Dabei entstanden aber bei 30 000 und 50 000 Dalton zwei neue Banden und eine Doppelbande bei 40 000 bis 42 000 Dalton. Bei einer länger andauernden Proteolyse (60 Minuten), bei der die Aktivität der CaT schon geringer wurde, wiesen sie Bruchstücke mit folgenden Molekulargewichten nach: 14 000, 28 000, 33 500, 48 000, 76 000 und in geringfügigem Umfang, 25 000 Dalton. Da so viele unterschiedliche Peptide bei verschieden langen Proteolysezeiten entstehen, ist nicht auszuschließen, daß der Abbauweg über mindestens zwei unterschiedliche Wege läuft (GRAF et al., 1982).

Mit radioaktiv markiertem ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP konnte gezeigt werden (CARAFOLI & ZURINI, 1982), daß das Peptid, welches das Phosphoenzym bildet, ein Molekulargewicht von 76 000 bis 81 000 Dalton hat. Mit  $^{125}\text{Jod}$  markiertem, mit einer Azidogruppe gekennzeichnetem Calmodulin (Azido-CaM) gelang es dann ANDREASEN et al. (1981), nachzuweisen, daß die Bindungsstelle für Calmodulin am Peptid mit 90 000 Dalton liegt. Damit widerlegten sie die Vermutung von ENYEDI et al. (1980), SARKADI et al. (1980) und von STIEGER und SCHATZMANN (1981). Die Bindung mit dem Azido-CaM ist kovalent, sie konnte nachgewiesen werden, ganz gleich ob Azido-CaM vor oder nach der Proteolyse mit Trypsin

zugesetzt wurde. Im Gelelektropherogramm zeigte sich eine Bande bei 107 000 Dalton, was der Summe von 90 000 und 17 000 (=CaM) entspricht. Alle anderen Polypeptide wurden nicht mit dem Azido-CaM markiert.

ROUFOGALIS et al. (1982) bestätigten diesen Befund durch Kennzeichnung der Erythrocytenmembran mit <sup>125</sup>Jod-Azido-CaM und anschließender Proteolyse. Sie geben das Molekulargewicht des gekennzeichneten Peptids mit 92 000 Dalton an. Allerdings wiesen sie auch eine geringfügige Anlagerung an ein Peptid mit 22 000 Dalton nach. Letzteres konnte auch von CARAFOLI et al. (1982) bestätigt werden, allerdings nur, wenn Azido-CaM nach der Proteolyse zugesetzt wurde. Das Molekulargewicht des markierten Peptids betrug dann 38 000 bis 40 000 Dalton. Dies entspricht einem Molekulargewicht von 21 000 bis 23 000 Dalton nach Abzug des Molekulargewichtes von CaM. Mit einer CaM-Affinitäts-Chromatographie konnte schließlich bestätigt werden, daß das Azido-CaM sich kovalent an ein Peptid mit ca. 90 000 Dalton bindet (CARAFOLI & ZURINI, 1982).

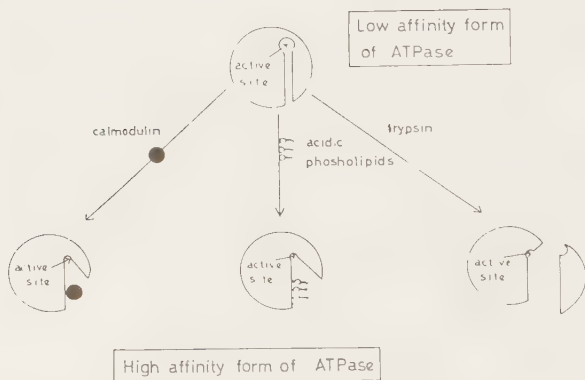
Am Enzym, das nicht mit Trypsin gespalten worden war, konnten zweierlei Bindungsstellen für Azido-CaM gezeigt werden, wobei sich Molekulargewichte von 155 000 und 172 000 Dalton ergaben. Aus dem höheren Molekulargewicht kann man schließen, daß hier zwei Calmodulinmoleküle an ein Molekül der CaT gebunden werden (CARAFOLI & ZURINI, 1982).

## 2.2 Durch eine Aktivierung mit Phospholipiden und Fettsäuren

Bei dieser Aktivierung durch Phospholipide und Fettsäuren handelt es sich vermutlich um eine sehr starke Bindung an das Enzym. Die Aktivierung des Enzyms ent-

spricht dabei der Aktivierung, die durch Calmodulin erzielt werden kann. Vermutlich wird am Enzym der Rezeptor für Calmodulin besetzt (NIGGLI et al., 1981). Es könnte sich aber auch um eine hydrolytische Wirkung direkt am Enzym selbst handeln (TAVERNA & HANAHAN, 1980). Der Effekt der Stabilisierung und Reaktivierung des in solubilisiertem Zustand instabilen Enzyms mit sauren Phospholipiden und langkettigen Fettsäuren wurde auch von RONNER et al. (1977) beschrieben. VINCENZI (1982) stellt die Vermutung auf, daß das saure Calmodulin durch die amphiphatischen Anionen der Phospholipide bzw. der langkettigen Fettsäuren nachgeahmt wird, allerdings aber in einer unspezifischen Form, da sie bei einigen CaM-sensitiven Enzymen weniger wirksam sind.

Schema 2 ist ein Modell, wie man sich die Besetzung des Rezeptors am Enzym vorstellt.



Schema 2: Angriffspunkte am CaT-Molekül durch verschiedene Substanzen und die daraus resultierende Konformationsänderung (nach CARAFOLI & ZURINI, 1982).

### Calmodulin

#### Der Wirkungsmechanismus von Calmodulin zur Aktivierung Calmodulin-abhängiger Enzyme

Calmodulin (CaM) kommt in allen eukaryonten Zellen vor (KILHOFFER et al., 1983); es handelt sich um ein hitze- und säurestabiles (KLEE, 1980) Protein mit nur einer Kette aus 148 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 17 800 Dalton (CHEUNG, 1980 und 1982). Bei sehr vielen Enzymen oder zellulären Prozessen spielt Calmodulin eine aktivierende Rolle, wobei Calmodulin erst 4  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden muß (MEANS & DEDMAN, 1980) (siehe auch Schema 3). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen am Calmodulin vermögen neben  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen und monovalente Kationen kompetitiv zum  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden (KOHSE & HEILMEYER, 1981; KILHOFFER et al., 1983).

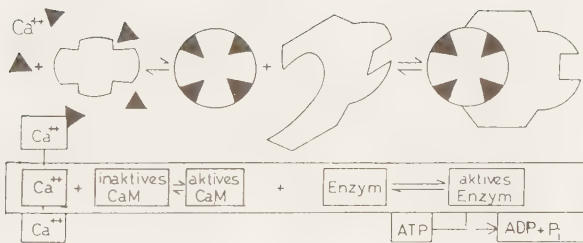
Die Interaktion zwischen Calmodulin und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist mittlerweile bestens erforscht (MEANS & DEDMAN, 1980; WESTHEIMER, 1980). Nach der Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  erfährt das Calmodulin eine Konformationsänderung und kann erst dann mit dem Enzym eine Bindung eingehen. Die Bindung des Calmodulin an das Enzym ist noch weniger gut erforscht, da die durch Calmodulin aktivierbaren Enzyme sehr unterschiedlich sind und wahrscheinlich keine übereinstimmende Bindungsstelle besitzen (MEIJER & GUERRIER, 1982). Vermutlich ist den Enzymen aber eine ähnliche Bindungsstelle für Calmodulin und auch ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus gemeinsam (KLEE, 1980).

Eine Interaktion zwischen Calmodulin und der CaT der Humanerythrocyten konnte chromatographisch nachgewiesen werden (ANDREASEN et al., 1981). LOPASCHUK (zitiert nach PENNISTON, 1982) wies die Bindung mit  $^{125}\text{Jod}$ -Calmodulin nach. Mit Calmodulin, markiert mit

einer Azido-Gruppe, gelang es dann, die Bindungsstelle für CaM mit und ohne Trypsinspaltung näher zu charakterisieren (siehe unter II, 2.1).

KUZNICKI et al. (1981) konnten nach Spaltung von Calmodulin zeigen, daß die 4 resultierenden Bruchstücke ebenfalls eine Aktivierung calmodulin-abhängiger Enzyme ähnlich dem nicht gespaltenen Calmodulin bewirken. Der aktivierende Effekt der Calmodulin-Bruchstücke ist aber wesentlich geringer und abhängig von dem jeweilig eingesetzten Fragment (I, II, III oder IV). Vermutlich liegt diese unterschiedliche Aktivierung daran, daß bei einer proteolytischen Spaltung mit Trypsin auch der Bereich III und IV gespalten wird, wodurch ein wesentlicher Teil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsfähigkeit verlorenght (ANDERSSON et al., 1983).

Durch Calmodulin wird die CaT der Humanerythrocyten aus einem Zustand geringer Aktivität und geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität in einen Zustand hoher Aktivität und hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität angehoben (SARKADI et al., 1982), wobei der Übergang von der niedrigen zur hohen Aktivität eine Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist (SCHARFF & FODER, 1978).



Schema 3: Schematische Darstellung der Aktivierung des Calmodulins mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen (CHEUNG, 1982)

Bei erhöhtem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt in der Zelle verbinden sich 4 Ca<sup>2+</sup>-Ionen mit Calmodulin, wobei Calmodulin einer Konformationsänderung unterliegt. Erst dieser an das Enzym angelagerte Komplex ermöglicht den aktiven Ca<sup>2+</sup>-Transport.

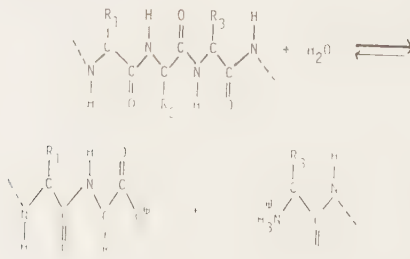
## 4 Proteasen

### 4.1 Ihre physiologische Bedeutung

Proteine stellen einen ganz wesentlichen Bestandteil des Organismus von Tieren, Menschen und Pflanzen dar. Sie unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau; die biologische Halbwertszeit für Plasmaalbumin (Mensch) beträgt etwa 25 - 30 Tage. Das bedeutet, daß zu diesem Zeitpunkt die Hälfte des Proteins abgebaut und durch neues ersetzt ist. Insgesamt baut der menschliche Körper etwa 400 g Eiweiß pro Tag ab und auch wieder auf. Im Gegensatz zu Pflanzen ist der Mensch und das Tier auf die Zufuhr von Proteinen angewiesen. Diese werden durch Proteasen im Organismus gespalten, wobei letztlich Aminosäuren entstehen, aus denen dann entweder neue Proteine synthetisiert werden oder die weiter abgebaut und als Harnstoff ausgeschieden werden (KARLSON, 1974).

### 4.2 Chemischer Vorgang der Proteolyse

Die Proteasen oder Proteinasen zählen zu den C-N-Hydrolasen. Sie katalysieren die Spaltung von Peptiden nach folgender Gleichung:



Das Reaktionsgleichgewicht liegt auf der Seite der Spaltprodukte, dabei ist keine Koppelung an einen energieliefernden Prozeß notwendig. Die chemische Energie, die frei gesetzt wird, wird in Wärme umgewandelt (KARLSON, 1974). Gegenüber anderen Enzymen, die substratspezifisch spalten, liegt der Angriffsort der Proteasen in bestimmten Strukturmerkmalen in der Peptidkette. Die Hydrolyse durch Proteasen erfolgt an bevorzugten oder ganz bestimmten Stellen der Aminosäurekette (ALLEN, 1981). Dabei werden die Aminosäuren Glutamin, Threonin und Tyrosin besonders leicht gespalten (KASPAR, 1975). Denaturierte Proteine werden leichter hydrolysiert als native. Einen wesentlichen Faktor für die Verdauung stellt aber auch der pH-Wert, die Temperatur und das Mengenverhältnis zwischen Protein und Protease sowie die Einwirkdauer dar (KASPAR 1975, SMYTH 1981).

#### 4.3 Einteilung der Proteasen

##### 4.3.1 Einteilung nach der Wirkung im Organismus

Biologisch gesehen sind die Proteasen Verdauungsenzyme. Man unterscheidet Endopeptidasen und Exopeptidasen, wobei letztere noch in Carboxypeptidasen (Spaltung vom Carboxylende her) und Aminopeptidasen (Spaltung vom Aminoende her) unterteilt werden können. Exopeptidasen spalten bevorzugt kleinere Peptide (Oligo- und Polypeptide) (ALLEN, 1981).

Im weiteren werden nur noch Endopeptidasen behandelt, da nur solche in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Diese hydrolysieren langkettige Polypeptide an bestimmten Stellen der Aminosäurekette des Moleküls. Dabei zeigen auch diese Proteasen eine gewisse Spezi-

fität, betreffend den Angriffsort innerhalb der Aminosäurekette; dieser ist für jede Protease verschieden.

#### 4.3.2 Einteilung nach spezifischen Eigenschaften

- a. Serinproteasen mit einem Serin und einem Histidin im aktiven Zentrum (Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin)
- b. HS-Proteasen mit einem Cysteinrest im aktiven Zentrum (Papain)
- c. Metallproteasen mit einem Metallion ( $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) im aktiven Zentrum (Thermolysin)
- d. Saure Proteasen, die spalten nur im sauren pH-Bereich (Pepsin)
- e. Enzyme mit ungenau untersuchtem Reaktionsmechanismus  
(KARLSON, 1974)

#### 4.4 Anwendungsmöglichkeiten der Proteasen

##### 4.4.1 Zur Aminosäureanalyse und Aminosäuresequenzanalyse

Zunächst müssen hierfür die Proteine denaturiert werden, je nachdem, wie groß die Bruchstücke nach der Proteolyse sein sollen, können ganz spezifische Proteasen bzw. beschränkte Einwirkdauer gewählt werden (SMYTH, 1981).

- a. Zur Spaltung in größere Peptide eignen sich z.B. Trypsin (s. II/4.5), aber auch eine argininspezifische Protease (die Protease aus *Staphylococcus aureus*, die nur Glutaminreste angreift).
- b. Die Spaltung in kleinere Teile von ungefähr 10 Aminosäureresten kann dann ausgehend von a. oder auch direkt erfolgen, wobei die Spezifität in der Reihe der aufgezählten Proteasen abnimmt (Trypsin,

$\alpha$ -Chymotrypsin, Thermolysin, Papain, Nagarse und Ficin) (ALLEN, 1981).

#### 4.4.2 Zur Untersuchung von Enzymen

Die Enzyme werden hierbei in nativem Zustand verwendet. Dies ist nötig, da bestimmte Eigenschaften an den gespaltenen Bruchstücken untersucht werden sollen und durch eine Denaturierung die Protein- bzw. Peptidkette in ihrer Konformation verändert wird. Im Idealfall wirkt die Protease nur kurz auf das Protein (Enzym) ein und wird nach einer bestimmten Zeit mit einem Inaktivator inhibiert.

#### 4.5 Einige spezifische Eigenschaften der bei den Versuchen verwendeten Proteasen

In Tabelle 2 sind für die im folgenden beschriebenen Proteasen die spezifischen Eigenschaften zusammengefaßt.

##### Trypsin:

Trypsin hat die höchste Spezifität der bekannten Proteasen (KASPAR, 1975; SMYTH, 1981) und wird im Pankreas als Vorstufe (Trypsinogen) gebildet und im Dünndarm durch eine Enteropeptidase in das aktive Enzym umgewandelt (KARLSON, 1974). Trypsin spaltet bevorzugt am C-terminalen Ende der Aminosäuren Lysin und Arginin und der darauffolgenden  $\text{NH}_2$ -Gruppe, dies aber nur, wenn kein Prolin folgt, da in diesem Fall die Hydrolyse sehr langsam erfolgt. Die Hydrolyse am Arginin geht schneller vor sich als die am Lysin, außer es befindet

sich ein saurer Rest auf einer der beiden Seiten, dann ist die Hydrolyse vermindert (KASPAR, 1975; ALLEN, 1981; SMYTH, 1981). Trypsin zeigt auch eine geringfügige Exopeptidase (Aminopeptidase)-Eigenschaft (ALLEN, 1981). Eine eventuelle Autolyse des Trypsins kann durch Zusatz von 0,1 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  verhindert werden. In einer 0,1 mmol/l HCl ist Trypsin bei  $-20^\circ\text{C}$  über längere Zeit haltbar (KARLSON, 1974).

#### $\alpha$ -Chymotrypsin:

$\alpha$ -Chymotrypsin wird ebenfalls im Pankreas als Vorstufe gebildet (Chymotrypsinogen). Im Dünndarm wird durch Trypsin eine Arg-Ile Bindung gespalten und so das aktive Enzym gebildet (KARLSON, 1974). Bevorzugt spaltet  $\alpha$ -Chymotrypsin an den C-terminalen Enden der Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan und der darauffolgenden  $\text{NH}_2$ -Gruppe. Bei längerer Einwirkdauer erfolgt eine Hydrolyse an den C-terminalen Enden von Methionin, Glutamin, Asparagin, Histidin und Threonin, diese Spaltungen erfolgen allerdings wesentlich langsamer und in geringerem Umfang (KASPAR, 1975; SMYTH, 1981). Um seine volle Stabilität zu behalten, benötigt  $\alpha$ -Chymotrypsin  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, aber auch die Anwesenheit eines Substrates (SMYTH, 1981). Es kommt nicht bzw. kaum zur Hydrolyse, wenn Prolin auf eine sonst angreifbare Aminosäure folgt. Benachbarte saure Reste vermindern, benachbarte basische Reste verstärken die Wirkung (ALLEN, 1981). Wenn nur eine ganz spezifische Proteolyse erfolgen soll, sollte die Protease nur kurz auf das Substrat einwirken, da sonst auch zwischen Aminosäurebrücken eine Spaltung erfolgen kann, die normalerweise durch  $\alpha$ -Chymotrypsin nicht geschieht (ALLEN, 1981).

### Thermolysin:

Thermolysin, eine Metallo-Endopeptidase aus *Bacterium thermophilum* enthält in kristalliner Form auf 35 000 MOL 1 MOL Zink und 3 - 4 MOL Calcium. Zink befindet sich im aktiven Zentrum. Während Calcium einen positiven Einfluß auf die Thermostabilität hat, ist Zink und ein reaktiver Histidylrest für die Aktivität verantwortlich (KASPAR, 1975; MATSUBARA, 1981). Bis zu einer Temperatur von 60 °C ist Thermolysin stabil (KARLSON, 1974). Bevorzugt spaltet Thermolysin die Aminosäurebindungen, in deren Nähe auch Aminogruppen von hydrophoben Aminosäuren mit langen Seitenketten vorhanden sind (MATSUBARA, 1966), dies gilt auch bei Isoleucin, Leucin, Valin, Phenylalanin, Methionin und Alanin. Ganz selten unter bestimmten Bedingungen werden die NH<sub>2</sub>-terminalen Enden von Tyrosin, Glycin, Threonin und Serin gespalten (MATSUBARA 1981). Im Gegensatz zu Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin spaltet Thermolysin bevorzugt an den N-terminalen Enden der Aminosäureketten. Prolin hat auch hier einen hemmenden Einfluß, aber nur, wenn am C-terminalen Ende der Aminosäure eine hydrophobe Aminosäure folgt (ALLEN, 1981; MATSUBARA, 1981). Ein Zusatz von 1 mmol/l CaCl<sub>2</sub> verbessert die Thermostabilität (ALLEN, 1981).

### Papain

Papain wird aus den Früchten des Melonenbaumes *Carica papaya* gewonnen. In kristalliner Form ist die Protease Papain sehr stabil, gelöst verliert das aktive Enzym täglich 1 - 2 % an Aktivität. Besonders stabil ist Papain gegenüber hohen Temperaturen, organischen Lösungsmitteln und Reagenzien, durch die andere Proteasen denaturiert werden würden.

Instabil ist Papain bei pH-Werten unter 2.8 (ARNON, 1981). Die Aminosäuresequenz an der möglichen Spaltstelle hat einen beträchtlichen Einfluß auf die Anzahl der Spaltungen. Besonders die Bindung zwischen -X-Y- in der Folge -Phenylalanin-X-Y- ist sehr empfindlich. Papain ist eine Thiol-Protease und wird durch oxidierende Reagenzien, Schwermetalle und alkylierende Substanzen, wie Jod-Essigsäure gehemmt, daher ist die Anwesenheit von komplexbildenden und reduzierenden Reagenzien für eine volle Aktivität notwendig (ALLEN, 1981; ARNON, 1981). Weiterhin sind die C-terminalen Enden von Lysin und Arginin, soweit diese nicht NH<sub>2</sub>-terminal vorliegen, gegenüber Papain empfindlich. Eine schnelle Hydrolyse erfolgt auch an den C-terminalen Enden der Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure, Glutamin, Leucin und Tyrosin. Die Anzahl an Hydrolysen ist je nach Substrat sehr unterschiedlich (SMYTH, 1981).

#### Nagarse:

Nagarse wird aus *Bacillus subtilis* gewonnen (KARLSON, 1974). Sie katalysiert die Spaltung einer großen Anzahl von Peptidbindungen, eignet sich allerdings nicht zur Spaltung denaturierter Proteine, ist aber sehr wertvoll zur Spaltung von Peptidbindungen, die von anderen Proteasen nicht gespalten werden (ALLEN, 1981; SMYTH, 1981). Nagarse ist stabil in einer 1 %igen SDS-Lösung (ALLEN, 1981).

#### Ficin:

Es handelt sich bei Ficin um eine ziemlich unspezifische Protease, die die Peptidbindungen einer großen Anzahl von natürlichen Substraten hydrolysiert (z.B. Gelatine, Kollagen, Milchproteine, Haemoglobin, Ela-

stin, Fibrin, Fibrinogen und sogar lebende Askariden); weiterhin hydrolysiert sie von synthetischen Substraten die Peptid-, Ester- und Amidbindungen. Zugrundegelegt wird die allgemeine Formel  $-NH - CHR - CO - X$ , die  $-CO - X$ -Bindung wird gespalten, wenn R als Seitenkette einen Glycin-, Serin-, Threonin-, Methionin-, Lysin-, Arginin-, Citrullin-, Leucin-, Isoasparagin- oder Tyrosin-Rest darstellt. Die X-Komponente des Substrats kann außer einem Aminosäure-, Alkohol-, Anilin- oder p-Nitrophenol-Rest auch  $-NH_2$  oder  $-SH$  sein.

Ficin ist eine pflanzliche Protease, die in der Rinde verschiedener Ficusarten vorkommt, wobei eine unterschiedliche Aktivität der Proteasetätigkeit aus verschiedenen Ficusarten gefunden wurde. *F.stenocarpa* zeigte die höchste, gefolgt von *F.carica* und *F.glabrata*. Innerhalb von 6 Ficusarten wurden aus den gewonnenen Ficinkomponenten 26 chromatographisch verschiedene Enzymspezies festgestellt. Als Aktivator kann EDTA in Verbindung mit einem reduzierenden Agens wie Cyanid, Cystein, 1,2-Dimercaptopropanol oder Mercaptoethanol verwendet werden (LIENER, 1970).

Tab. 2: Einige Daten zu den in dieser Arbeit verwendeten Proteasen  
(zusammengestellt nach LIENER, 1970; KARLSON, 1974; ALLEN, 1981; MATSUBARA, 1981  
und Serva-Katalog 1983)

| Protease               | Vorkommen              | pH-Opt. | Akt.<br>Zentrum | Spezifität                                                           | Spez. Inhibitoren                                                     | Mol. Gew.          |
|------------------------|------------------------|---------|-----------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Trypsin                | Dünndarm               | 7,5-8,5 | Ser...His       | Arg--, Leu--                                                         | Trypsininhibitor<br>TLCK                                              | 24 000<br>(223 AS) |
| $\alpha$ -Chymotrypsin | Dünndarm               | 7 -8    | Ser...His       | Tyr--, Trp--,<br>Phe--, Met--                                        | DFP, TPCK                                                             | 25 000<br>(246 AS) |
| Papain                 | Papaya-<br>frucht      | 5 -7    | HS-Gruppe       | Arg--, Lys--,<br>Phe-X-Y-                                            | SH-Reagenzien<br>Oxidierende Reag.<br>alkyl. Reag.<br>(Jodessigsäure) | 21 000<br>23 400   |
| Thermolysin            | Bakterien              | 6 -10   | $Zn^{2+}$       | --Leu, --Phe<br>--Met, --Trp,<br>--Val, Ala--<br>Tyr--, Thr--<br>Ile | Komplexbildner<br>(EDTA), Oxalat                                      | 35 500             |
| Nagarse                | Bakterien              |         | Ser             | unspezifisch                                                         |                                                                       | 26 700             |
| Ficin                  | Ficin spec.<br>(Latex) | 6,6-7,2 |                 | unspezifisch                                                         | Thiol-Reagenzien<br>DFP                                               | 26 000             |

### III

#### EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Es wurde die Restaktivität der CaT nach proteolytische Spaltung mit verschiedenen Proteasen bestimmt unter Messung des frei werdenden Phosphats. Anschließend wurden durch Gelelektrophorese die anfallenden Peptidbruchstücke charakterisiert, das heißt, das Molekulargewicht wurde bestimmt. Des weiteren wurde der Einfluß von Calmodulin auf die CaT nach proteolytischer Spaltung untersucht.

#### 1

##### Materialien

Alle verwendeten Substanzen waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad. Nicht aufgeführte Substanzen waren von der Firma E. Merck, Darmstadt.

Zum Ansetzen sämtlicher Lösungen wurde Aqua bidestillata (Quarz) verwendet.

| <u>Materialien</u>                 | <u>Firma</u>           |
|------------------------------------|------------------------|
| Acrylamid, reinst 2 krist.         | Serva                  |
| Ethanolamin, p.a.                  | Serva                  |
| Ammoniumpersulfat                  | Serva                  |
| Blut (Gruppe 0, Rh <sup>+</sup> )  | Blutspendezentrale Ulm |
| Coomassie brilliant Blue G250 rein | Serva                  |
| L-Chymotrypsin                     | Serva                  |
| DEAE Cellulose, DE-52              | Whatman                |
| Desoxycholsäure                    | Serva                  |
| Diisopropylfluorophosphat (DFP)    |                        |
| reinst                             | Serva/Fluka            |
| Dithiothreitol (DTT)               | Serva                  |
| Dodecylsulfat, Na- (SDS) krist.,   |                        |
| reinst                             | Serva                  |

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| Ficin                                          | Serva     |
| Jodessigsäure, purr.                           | Serva     |
| N',N'-Methylbisacrylamid 2 krist.,<br>reinst   | Serva     |
| N'-Morpholinopropansulfonsäure<br>(MOPS), p.a. | Serva     |
| Nagarse                                        | Serva     |
| Norit A                                        | Serva     |
| Papain                                         | Serva     |
| Pyronin G, pract.                              | Serva     |
| Saccharose, p.a.                               | Serva     |
| Sephacrose 4B CNBr-aktiviert                   | Pharmacia |
| Thermolysin                                    | Serva     |
| Trypsin                                        | Serva     |
| Trypsininhibitor                               | Serva     |
| Triton-X-100                                   | Serva     |
| Tween 20                                       | Sigma     |

## 2 Allgemeine Methoden

Der pH-Wert der verwendeten Lösungen wurde, sofern im Text nichts anderes angegeben ist, mit dem jeweiligen Gegenion eingestellt.

### 2.1 Aktivitätsbestimmung

Die CaT der Humanerythrocyten spaltet ATP nach der allgemeinen Formel:



Bei diesem Vorgang wird Energie frei, die für den Ionen-transport verwendet wird.



## 2.2 Proteingehaltsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der von ROSS & SCHATZ (1973) modifizierten Methode von LOWRY (1951). Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Diese Bestimmungsmethode ermöglicht es auch, in Anwesenheit von Sulfhydryl-(SH)-Reagenzien den Proteingehalt zu bestimmen.

## 2.3 Calmodulin

### 2.3.1 Präparation von Calmodulin

Calmodulin wurde aus zwei verschiedenen Ausgangsprodukten hergestellt, nämlich aus dem Hämolysat der Erythrocyten und aus vom Schlachthof jeweils frisch geholtem Rinderhirn. Der erste Schritt, die Ausfällung einer noch unreinen Calmodulinfraktion, war für die beiden Ausgangsprodukte unterschiedlich. Die weiteren Schritte zur Präparation des chromatographisch reinen Calmodulins waren dann gleich.

#### a Calmodulin aus Hämolysat

Die ersten drei Hämolysate (s. III/2.6.1), ca. 4 - 5 l, wurden mit einer 1 mol/l Essigsäure auf pH 6.0 eingestellt, mit 20 g DE-52 versetzt und eine Stunde bei 0 - 4 °C vorsichtig gerührt. Dabei bindet das Calmodulin an das Gel. Die Abtrennung des calmodulinfreien Hämolysats vom Calmodulin-DE-52 Gel erfolgte über eine G<sub>3</sub>-Fritte. Das Gel wurde noch mehrmals mit Puffer I (100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Imidazol, pH 7.5) nachgewaschen, bis der Durchlauf klar war. Vom Gel gelöst wurde das Calmodulin mit ca. 500 ml Puffer II (600 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Imidazol, pH 7.5). Diese calmodu-

linenthaltende Lösung wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und weiter verarbeitet, wenn eine größere Menge vorhanden war (s. unten).

b Calmodulin aus Rinderhirn (nach GIETZEN, Diss. 1980)

Das Großhirn wurde enthäutet und von Fett und Bindegewebe befreit. Mit einem Mixer wurde es fein zerkleinert und 1:1 mit dem Homogenisationspuffer (20 mmol/l Tris-HCl, 2 mmol/l  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 6.8) homogenisiert. Dabei wird das Calmodulin in Lösung gebracht. Durch Zentrifugation ( $4000 \times g$ ) wurde der calmodulinarme feste Teil vom Überstand getrennt. Das Pellet wurde mit der gleichen Menge des oben genannten Puffers nochmals homogenisiert und wiederum wie oben beschrieben zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und wie im folgenden beschrieben, weiterverarbeitet.

c Schematische Darstellung der Präparation von reinem Calmodulin (Präp. nach KAKIUCHI et al., 1981, modifiziert nach GIETZEN, nicht veröffentlicht)

Sämtliche Arbeitsvorgänge erfolgten bei  $0 - 8^{\circ}\text{C}$ . Es wurden nacheinander zwei verschiedene Gelmaterialien verwendet. Zunächst wurde DE-52 im Puffer B aufgeschlämmt und in eine Säule ( $2.5 \times 20 \text{ cm}$ ) gefüllt. Das Säulenmaterial wurde mit diesem Puffer äquilibriert. Anschließend wurde Calmodulin mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (wie unter a und b beschrieben) ausgefällt in Puffer B gelöst und auf die Säule gebracht; die CaM-enthaltende Säule wurde ebenfalls mit Puffer B nachgewaschen. Die Elution des Calmodulins erfolgte mit einem Gradienten der

Lösungen C und D. Die calmodulinhaltigen und gel-chromatographisch reinen Fraktionen wurden nochmals ausgefällt, in Puffer E gelöst und über eine mit Fluphenazingel beschickte Säule (0.9 x 10 cm) mit Puffer E (wie oben für die DE 52-Säule beschrieben) entsprechend behandelt und mit den Puffern F/G (als Gradient) eluiert. Das calmodulinhaltige Material wurde jeweils mit einer Pumpe auf das Säulenmaterial aufgezogen, die Elution des Calmodulins wurde mit einem Fraktionssammler (in Mengen von 1,5 ml) aufgefangen und an der Aufzeichnung eines angeschlossenen Schreibers beobachtet (Methode nach JARRET & PENNISTON, 1978; CHARBONNEAU & CORMIER, 1979).

Verwendete Puffer:

Puffer B: 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l Mercaptoethanol (ME), 0.1 mmol/l  $\text{Na}_2$ -EGTA, pH 7.5

Puffer C: 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l ME, 0.1 mmol/l  $\text{Na}_2$ -EGTA, 145 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.5

Puffer D: 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l ME, 0.2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 300 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7.5

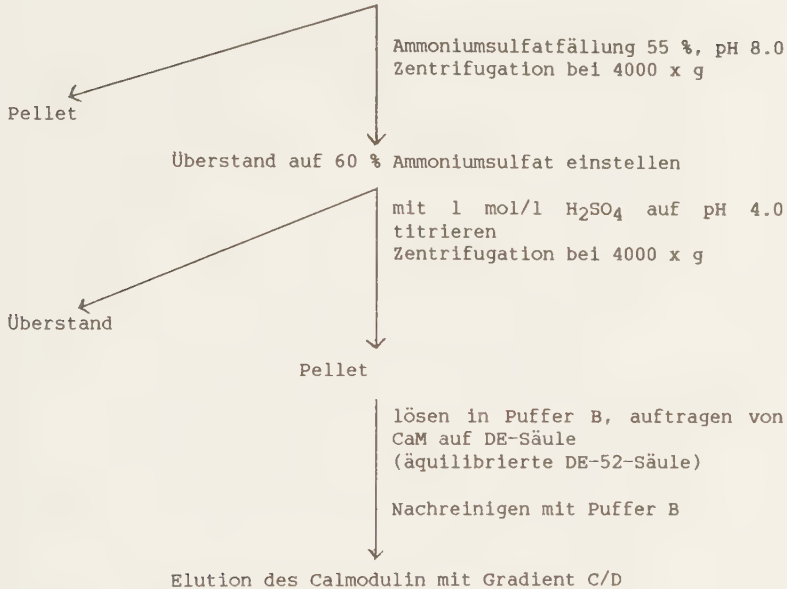
Puffer E: 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l ME, 0.15 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.5

Puffer F: 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l ME, 0.2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 500 mmol/l NaCl, pH 7.5

Puffer G: 20 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l ME, 2 mmol/l  $\text{Na}_2$ -EGTA, 500 mmol/l NaCl, pH 7.5

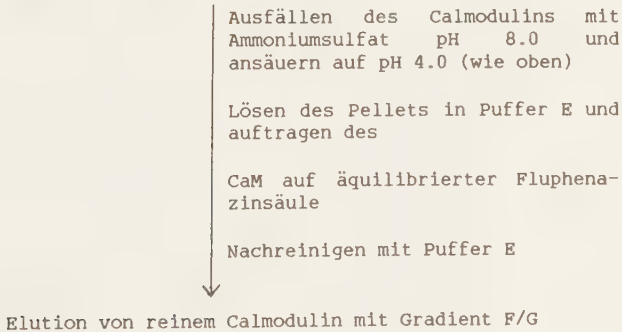
Calmodulinhaltende Lösung

(präpariert aus Hämolystat und Rinderhirn)



Calmodulinhaltende Fraktionen

Gepoolte gelelektrophoretisch reine Fraktion  
(ca. 10 - 15 ml)



Das eluierte CaM wurde vor der Verwendung als Aktivator der CaT bzw. vor der Herstellung eines Calmodulin-Affinity-Gels auf Proteingehalt und Homogenität (s. Gelelektropherogramm Abb. 15 Bande 2) untersucht. Die Bestimmung der Aktivität wurde mit dem unter III/2.6.1 beschriebenen membrangebundenen Enzym bestimmt; sie betrug  $1 \mu\text{g CaM Protein} = 1 \text{ U CaM}$ . 1 U CaM entspricht der Menge, die notwendig ist, um  $16 \mu\text{g CaT}$  um die Hälfte zu aktivieren ( $= v_{\text{max}}/2$ ). Für die unter III/3.6 beschriebenen Versuche wurde ein Teil des eluierten CaM mit dem unter III/2.1 beschriebenem Puffer so verdünnt, daß  $50 \mu\text{l}$  10 U CaM entsprachen.

### 2.3.2 Herstellung des Calmodulin-Affinity-Gels

Die Bindung des Calmodulins an das Gel erfolgte nach GIETZEN (1980 et al.) bzw. nach der Vorschrift auf dem Beipackblatt der Firma Pharmacia. 2.5 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurde 15 Minuten in 600 ml 1 mmol/l HCl gequollen, die Säure wurde anschließend über eine  $G_3$ -Fritte abgesaugt. Diesem vorbehandelten Gel wurden 25 mg Calmodulin und 50 ml Kopplungspuffer (0.5 mol/l NaCl, 0.1 mol/l  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8.0) zugesetzt. Diese Suspension wurde mit einem Rotationsmischer über zwei Stunden in Bewegung gehalten. Mit einer  $G_3$ -Fritte wurde der Kopplungspuffer und das nicht gebundene Protein abgesaugt, das Gel wurde dann nochmals mit ca. 300 ml Kopplungspuffer nachgewaschen. Anschließend wurden etwaige noch freie Bindungsstellen am Gel mit 50 ml 1 mmol/l Ethanolamin, pH 8.0 abgesättigt. Auch diese Suspension wurde wieder zwei Stunden mit einem Rotationsmischer in Bewegung gehalten.

Die Ethanolaminlösung wurde ebenfalls abgesaugt, dann wurde das Gel abwechselnd jeweils dreimal mit einem Boratpuffer (0.5 mol/l NaCl, 0.1 mol/l Natriumte-

traborat, pH 8.0) und einem Acetatpuffer (0.5 mol/l NaCl, 0.1 mol/l Natriumacetat, pH 4.0) gewaschen, um eventuell absorbiertes Protein zu entfernen.

Bis zur Verwendung und nach jeder Verwendung wurde das Calmodulin-Affinity-Gel in einem Puffer (20 mmol/l MOPS, 100 mmol/l KCl, 3 mmol/l  $\text{NaN}_3$ , pH 7.0) bei 0 - 4 °C aufbewahrt.

## 2.4 Desoxycholsäurereinigung

Da der Reinheitsgrad der gekauften Desoxycholsäure nicht hoch genug ist, um die CaT zu solubilisieren, wurde sie entsprechend der Vorschrift von GIETZEN (Diss. 1980) durch Umkristallisation über mehrere Schritte gereinigt. Es wurden 100 g Desoxycholsäure (K-Salz) in 1 l absolutem Ethanol unter Zusatz von 5 g Aktivkohle (Norit A) und 1 mmol/l  $\text{Na}_2$ -EDTA gelöst. Nach Kochen dieser Lösung für eine Stunde unter Verwendung eines Rückflußkühlers wurde diese in heißem Zustand filtriert. Der Vorgang der Aktivkohlebehandlung wurde so oft wiederholt, bis das Filtrat farblos war.

Zum Umkristallisieren eignet sich ein Ethanol/Aceton-gemisch (1:4); die Lösung wurde hierzu im Rotationsverdampfer auf 150 ml eingedampft, und anschließend wurden 600 ml Aceton dazugegeben. Nach nochmaligem Erhitzen und Eindampfen wurde die Lösung über mehrere Tage auf -20 °C abgekühlt, filtriert und die ausgefallenen Kristalle bis zur Gewichtskonstanz luftgetrocknet.

Als Stammlösung wurde eine 127 mmol/l DOC-Lösung hergestellt. Der Lösungsvorgang erfolgte unter ständigem Rühren, Zugabe von KOH und Einstellen der Lösung auf einem pH-Wert von 8.0; dabei muß beachtet werden, daß kein Überschuß an Alkali auftritt. Die eingestellte Lösung ist bei -20 °C über längere Zeit stabil.

## 2.5 Phosphatidylcholinherstellung

Phosphatidylcholin, das zur Präparation der gereinigten CaT aus der Membran der Humanerythrocyten eingesetzt wurde, wurde nach der Methode von SINGLETON et al. (1965) hergestellt.

## 2.6 Methoden zur Isolierung der gereinigten CaT der Humanerythrocyten

Die Isolierung der gereinigten CaT erfolgte nach der Methode von GIETZEN (Diss. 1980).

### 2.6.1 Präparation des membranengebundenen Enzyms

#### Vorbehandlung der Erythrocyten

Es wurde stets Blut der Blutgruppe 0 Rh<sup>+</sup> verwendet, das nicht älter als drei Tage war. Zur Entfernung der Leukozyten, der Blutfette, des Plasmas und des ACD-AG Stabilisators wurde das Blut insgesamt dreimal bei 15 °C mit einem Puffer der Zusammensetzung 150 mmol/l KCl, 20 mmol/l MOPS, pH 7.4, gewaschen. Zur Abtrennung der oben genannten Stoffe kamen ungefähr 5 l des Puffers auf jeweils 6 Beutel Blutkonserven zur Verwendung. Die Zentrifugationen wurden bei 4 000 x g durchgeführt, der Überstand wurde verworfen.

#### Hämolyse der Erythrocyten

Um die Membranen zu erhalten, die calmodulinfrei sind und eine Solubilisierung des Enzyms mit DOC zu lassen, wurde nach der von GIETZEN et al. (1981) beschriebenen Methode vorgegangen. Die Erythrocytenmembranen wurden mit Hilfe der isoosmotischen Gefrierhämolyse aufgebrochen. Die gereinigten Erythrocyten wur-

den 30 Minuten mit nachgereinigtem Stickstoff begast und dann mit dem ebenfalls begasten Hämolysepuffer (50 mmol/l KCl, 20 mmol/l MOPS, 20 mmol/l Ascorbinsäure, 1 mmol/l  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 10 g/l Tween 20, 0.2 mmol/l DFP, pH 7.4) 1:1 gemischt und sofort über ein Trockeneis / Methanolgemisch bei  $-80^\circ\text{C}$  durchgefroren. Über Nacht wurden diese jetzt hämolysierten Erythrocyten bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### Trennung der Membranen vom Hämolysat

Sämtliche Arbeitsvorgänge (Austausch der Pufferlösungen, Zentrifugieren) wurden bei  $0-4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Zunächst wurden mit insgesamt 5 l Puffer I (50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Ascorbinsäure, 10 mmol/l MOPS, 0.5 mmol/l  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 0.2 mmol/l DFP, pH 7.0) die auf ca.  $4^\circ\text{C}$  aufgetauten Membranen dreimal gewaschen. Mit EDTA wurden noch vorhandene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abgesättigt, um noch gebundenes Calmodulin zu entfernen. Anschließend wurde noch zweimal mit Puffer II (50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Ascorbinsäure, 10 mmol/l MOPS, 0.1 mmol/l DFP, pH 7.0) gewaschen. Puffer I und II wurden immer frisch hergestellt ( $0-4^\circ\text{C}$ ) und vor Gebrauch mit  $\text{N}_2$  begast. Die Überstände der ersten drei Membranwäschen wurden zur Präparation von Calmodulin aufgehoben (s. III/2.3.1).

Dauer der Zentrifugationen und Beschleunigung:

- |    |        |           |             |
|----|--------|-----------|-------------|
| 1. | 90 min | Puffer I  | 37 000 x g  |
| 2. | 60 min | "         | 37 000 x g  |
| 3. | 45 min | "         | 37 000 x g  |
| 4. | 45 min | Puffer II | 37 000 x g  |
| 5. | 45 min | "         | 100 000 x g |

Nach der letzten Zentrifugation wurden die rosafarbenen, gewaschenen Membranen mit dem Einfrierpuffer (750 mmol/l Saccharose, 10 mmol/l MOPS, 1 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 200 mmol/l KCl, 10 mmol/l DTT, 2 mmol/l DFP,

pH 7.0, N<sub>2</sub>-begast) 2:1 gemischt, homogenisiert und bei -20 °C eingefroren. Für die Stabilität des Enzyms ist es wichtig, daß die Endkonzentration an Saccharose mindestens 500 mmol/l beträgt.

## 2.6.2 Solubilisierungs- und Reinigungsschritte bei der Präparation

### Solubilisierung

Das membrangebundene hämolysat- und calmodulinfreie Enzym wurde unter Verwendung von Na-DOC und eines Solubilisierungspuffers ("SL") bei 0-4 °C aus der Membran gelöst. Die Menge an DOC errechnet sich folgendermaßen: mg Membranprotein x 0.08 = mg DOC (nach GIETZEN, Diss. 1980). Mit der so berechneten DOC-Menge konnte die beste Aktivierung des Enzyms erreicht werden.

SL: 100 µl PC/100 ml Puffer (Entspr. : 0.2 mg PC/ml)  
100 mmol/l KCl  
1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>  
0.5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>  
10 mmol/l MOPS  
1 mmol/l TLCK  
10 mmol/l DTT      pH 7.0

### Binden des Enzyms an die CaM-Affinity-Säule und anschließende Elution

Das mit Na-DOC solubilisierete Enzym wurde mit dem Calmodulin-Sepharose-4B-Gel (s. III/2.3.2), das zuvor mit Puffer A äquilibriert wurde, eine Stunde mit einem Rotationsmischer bei 0-4 °C bewegt. Anschließend wurde das Gel über eine G<sub>3</sub>-Fritte durch Nachwaschen mit ca.

300 ml Puffer A von nicht gebundenen Proteinen getrennt. Das in Puffer A aufgeschlammte Gel wurde in eine Säule (2.5 x 20 cm) gefüllt. Noch verbliebene Reste nicht an das Säulenmaterial gebundener Proteine wurden ebenfalls mit etwa 200 ml Puffer A mit einer Fließgeschwindigkeit von 150 ml pro Stunde von der Säule eluiert. Die Elution der gereinigten CaT erfolgte mit Puffer B, in dem  $\text{CaCl}_2$  gegen EDTA ausgetauscht wurde. Hiermit wurde erreicht, daß das Enzym, das über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die CaM-Affinity-Säule gebunden war, gelöst wurde. Die Fließgeschwindigkeit hierbei betrug 45 ml pro Stunde. Der Enzympeak erschien auf einem angeschlossenen Schreiber im zweiten Teil eines Doppelpeaks.

#### Zur Herstellung der eingesetzten Puffer

Bevor den Puffern A und B, TLCK, DFP, DTT und Glycerin zugesetzt wurde, wurden diese unter  $\text{N}_2$ -Begasung mit einem Branson Sonifier B 12 bei Zimmertemperatur, Einstellung 6 bis die Lösung klar war, beschallt. Eingesetzt wurden diese erst, wenn sie auf 0-4 °C abgekühlt waren.

| Puffer I     |                     | Puffer II  |
|--------------|---------------------|------------|
| 100 mmol/l   | KCl                 | 300 mmol/l |
| 0.1 mmol/l   | $\text{CaCl}_2$     | --         |
| --           | $\text{Na}_2$ -EDTA | 1 mmol/l   |
| 0.5 mg/ml    | PC                  | 0.5 mg/ml  |
| 1.25 mg/ml   | Tween 20            | 0.25 mg/ml |
| 0.5 mg/ml    | Triton-X-100        | 0.5 mg/ml  |
| 200 mmol/l   | Saccharose          | 200 mmol/l |
| 1 mmol/l     | $\text{MgCl}_2$     | 1 mmol/l   |
| 20 mmol/l    | MOPS                | 20 mmol/l  |
| 5 mmol/l     | DTT                 | 5 mmol/l   |
| 15 mmol/l    | DFP                 | 10 mmol/l  |
| 0.1 mmol/l   | TLCK                | 0.1 mmol/l |
| 250 mmol/l   | Glycerin            | 250 mmol/l |
| 0 °C, pH 7.0 |                     |            |

Insgesamt wurden je Enzympräparation (aus 6 Beuteln Erythrocytenkonzentrat) 7 - 10 ml gelchromatografisch reine CaT gewonnen. Die höchste spezifische Aktivität, die je bei einer Präparation gemessen wurde, betrug 8.0 - 9.0  $\mu\text{mol}$  pro Minute und mg Protein. Der Aktivierungsfaktor der reinen CaT mit 10 U CaM lag im allgemeinen bei 8.0 (Ausnahme Abb. 5). Diese Werte unterliegen gewissen Schwankungen, was vermutlich an dem unterschiedlichen Spenderblut bzw. dem Alter der Blutkonserve liegt.

Da das Enzym in dem Zustand, wie es von der Säule eluiert wird, sehr instabil ist, wurde  $\text{CaCl}_2$  (Endkonzentration 0.04 mmol/l) und gelchromatographisch reines Calmodulin (ca. 40 U/100  $\mu\text{l}$ ) zugesetzt. Anschließend wurde das Enzym in einzelnen Reagenzgläsern, so wie es von der Säule eluiert wurde, bei -196 °C eingefroren.

Die Reinheit der CaT verschiedener Präparationen und Fraktionen wurde mit der SDS-Gelelektrophorese geprüft (s. III/2.7). Die Fraktionen, die im Gel nur eine Bande zeigten, wurden vermischt und wieder in kleinen Mengen von 1.5 ml bei -196 °C eingefroren. Das Zusammenschütten verschiedener Fraktionen war nötig, da für die verschiedenen Untersuchungen ein in sich einheitliches Enzym erwünscht war, um einen besseren Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen. Der Proteingehalt dieses in sämtlichen Versuchen verwendeten Enzyms betrug 0.325 mg/ml. Die spezifische Aktivität lag bei 6.353  $\mu\text{mol}$  pro Minute und mg Protein. Zur Homogenität der CaT vergleiche Abb. 15 Bande 1.

Nach dem nochmaligen Einfrieren zeigte sich jener Effekt, der auch von CARAFOLI & ZURINI (1982) erwähnt wird, daß nämlich bei einer erneuten Gelelektrophorese weitere neue Banden bei ca. 200 000 bis 240 000 und bei 90 000 bis 100 000 Dalton erscheinen. Die eine Bande entsteht vermutlich durch Ausbildung unlöslicher Komplexe, die andere durch Spaltung des Enzyms.

## 2.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Reinheit der hergestellten Proteine (CaT, Calmodulin ) und um die Molekulargewichte der bei der Proteolyse anfallenden Peptide bestimmen zu können, wurde auch hier die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewählt. Die Peptid- und Proteinlösungen, die im allgemeinen sehr verdünnt waren, wurden mit einer 1 mol/l Trichloressigsäurelösung bei 0 °C ausgefällt; nach einer Zentrifugation bei ca. 1000 x g wurde der Niederschlag in Lösung gebracht. Entweder wurde dieser in einem Medium folgender Zusammensetzung: 10 mmol/l NaOH, 10 mmol/l DTT, 350 mmol/l SDS oder in einer 320 mmol/l LiDS-Lösung gelöst. Die LiDS-Lösung hat den Vorteil, daß eine Trübung, die durch KCl (das in Puffer II enthalten ist, siehe III 2.6.2) bei Verwendung des zuerst genannten Puffers entsteht, nicht auftritt. Vor Auftragen der Lösung auf SDS-Polyacrylamidgele (703 mmol/l Acrylamid) wurde Saccharose in einer Endkonzentration von 500 mmol/l zugesetzt. Entsprechend der Methode von WEBER & OSBORNE (1969) wurde je Gel eine Spannung von 10 mA angelegt. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie-Blue nach FAIRBANKS (1971), wobei das Entfärben der Gele nur mit Lösung IV (1,653 mol/l Essigsäure) erfolgte. Dabei wurden ebenso gute Effekte erzielt wie bei einer langsamen Entfärbung mit abnehmenden Konzentrationen an Coomassie-Blue (Lösung II und III). Außerdem konnte mit dieser Entfärbungsmethode die Entfärbungszeit wesentlich verkürzt werden. Als Marker wurde Pyronin bei jeder Probe mitaufgetragen.

## 2.8 Bestimmung der spezifischen Aktivität und des Aktivitätsverlustes während der Versuche

Da sämtliche Aktivitätsbestimmungen mit Parallelpro-

ben an zwei Meßapparaten durchgeführt wurden, diese aber nicht immer übereinstimmende Werte lieferten, wurde vor jeder Messung der Gerätefaktor mit Hilfe eines Phosphatstandards mit bekanntem  $P_i$  bestimmt. Sämtliche Meßwerte wurden mit diesem Faktor korrigiert. Der während der Messungen (teilweise bis 6 Stunden) auftretende Aktivitätsverlust des Enzyms wurde rechnerisch ausgeglichen, indem in bestimmten Zeitabständen Kontrollmessungen durchgeführt wurden. Nach Bestimmung des Proteingehaltes (s. III/2.2) konnte die spezifische Aktivität ermittelt werden.

### 3 Spezielle Methoden und Versuchsauswertung

#### 3.1 Stabilität des Enzyms während der Messungen

Bevor die Versuche mit den Proteasen durchgeführt wurden, wurde die CaT zunächst auf ihre Stabilität hinsichtlich des Aktivitätsverlustes über einen Zeitraum von 360 Minuten untersucht. Das Enzym wurde bei 0 °C aufgetaut. Dann wurde entsprechend den später folgenden Inkubations-, Meß- und Proteolysezeiten 50 µl Enzym in Zeiten von 2, 7, 12, 17, 22, 27 und 32 Minuten bei 30 °C in 2 Ansätzen vorgewärmt, bevor ebenfalls auf 30 °C erwärmte Ansatzlösung (ad 8 ml) dazugegeben wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten wurde dann die verbliebene Aktivität durch Zugabe von 2 ml 5 mmol/l Mg-ATP bestimmt. Als weiteres wurde in bestimmten Abständen von ca. 30 Minuten, gerechnet vom Auftauen des Enzyms, jeweils eine Doppelmessung vorgenommen, wobei hier zum Enzym ohne Vorinkubation Ansatzlösung gegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug dann vor Zugabe von 2 ml 5 mmol/l Mg-ATP 10 Minuten.

### 3.2 Lösen der verwendeten Proteasen

#### 3.2.1 Verwendete Puffer

Es wurden zwei verschiedene Puffersysteme eingesetzt. Einerseits 17 mmol/l Imidazol, 130 mmol/l KCl, pH 7.0, was ENYEDI et al. (1980) bei der tryptischen Verdauung der CaT verwendet haben; andererseits das Medium, das der Endkonzentration an Ionen im Meßmedium entsprach (s. III/2.). Die Grundidee, den zweiten genannten Puffer zu verwenden, war, für das Enzym möglichst optimale Bedingungen zu schaffen, um durch einen Puffer anderer Zusammensetzung keinen Einfluß auf die Aktivität zu haben.

Tab. 3: Puffer zur Lösung der verwendeten Proteasen. Diese Tabelle gibt an, in welchem der beiden Puffer die Proteasen gelöst wurden.

| Puffer I               | Puffer II   |
|------------------------|-------------|
| Trypsin                | Thermolysin |
| $\Delta$ -Chymotrypsin | Nagarse     |
| Papain                 | Ficin       |
|                        | Papain      |

Da die Proteolyse mit Trypsin nur zum Vergleich zu den anderen durchgeführten Proteolysen diente, wurde Trypsin nur in dem Medium (130 mmol/l KCl, 17 mmol/l Imidazol, pH 7.0) gelöst, wie in den Versuchen von ENYEDI et al. (1980) beschrieben.  $\Delta$ -Chymotrypsin wurde in Puffer I gelöst, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß eine Lösung in Puffer II einen starken Aktivitätsverlust der Protease bewirkt, und daher eine Beurteilung der Ergebnisse nicht möglich ist.

Papain wurde sowohl in Puffer I als auch in Puffer II gelöst und für die Versuche eingesetzt, da bei Verwendung von Puffer II die Stabilität der Protease nicht ausreichend war. Bei Thermolysin, Nagarse und Ficin war nach Lösen in Puffer II nur ein geringer Aktivitätsverlust festzustellen, der rechnerisch ausgeglichen wurde.

Hergestellt wurde zunächst immer eine Stammlösung, die 100 mg Protease/100 ml Puffer enthielt (bei 0 - 4 °C). Der pH-Wert wurde auf 7.0 eingestellt. Für die Versuche wurden nur frisch hergestellte Proteasenlösungen verwendet. Dies war wegen eines Aktivitätsverlustes durch irreversible Denaturierung und einer Selbstverdauung nötig (SMYTH, 1981). Bei Verwendung von Puffer I als Lösungsmittel wurde dem Enzym noch 2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  zusätzlich zugesetzt, da dem Enzym nach Elution von der Säule vor dem Einfrieren nur eine, für das kleine Volumen und für die Stabilität ausreichende Menge an  $\text{CaCl}_2$  zugefügt worden war. Dieser Zusatz war nötig, da in Puffer I keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen enthalten waren, und während der Dauer der Proteolyse das Enzym durch einen Mangel an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an Aktivität verloren hätte.

### 3.2.2 Eingesetzte Aktivatoren und Stabilisatoren bei den untersuchten Proteasen

Um eine volle Aktivierung bzw. die aktive Form der Proteasen zu erhalten, wurde z. B. Thermolysin in einem Puffer gelöst, der 2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  (ALLEN 1981) enthielt; dem Lösungspuffer von Ficin wurde eine 300-fache Konzentration der Protease an DTT (LIENER & FRIEDENSON, 1970) zugesetzt. Der Lösungspuffer für Papain enthielt 1 mmol/l Mercaptoethanol. Die Verdünnungen wurden ebenfalls in Puffern mit diesen Zusätzen durchgeführt.

### 3.3 Einfluß einer hohen DTT-Konzentration auf die spezifische Aktivität des Enzyms

Da in der Stammlösung von Ficin (100 mg/100 ml) immerhin 177.6 mg DTT enthalten waren, wurde, um sicher zu gehen, daß diese hohe Konzentration an DTT der Aktivität des Enzyms keine Schädigung zufügt, dies durch eine Messung ausgetestet (s. Abb. 3). Bestimmte Zeiten (0 - 30 Minuten) wurde das Enzym, entsprechend der zeitabhängigen Proteolyse, einem DTT enthaltenden Puffer ausgesetzt bzw. mit ihm inkubiert und anschließend die verbliebene Aktivität des Enzyms bestimmt. Die Menge an DTT entsprach dabei der Menge, die bei einer Konzentration von 10 mg Ficin/ml Enzym\* auf das Enzym einwirkt.

### 3.4 Durchführung der Proteolyse

#### 3.4.1 Methodischer Aufbau

Für die zwei verwendeten Untersuchungen (konzentrationsabhängige-zeitgleiche und konzentrationsgleiche-zeitabhängige Proteolyse) wurde die Messung der verbliebenen Aktivität der CaT wie unter III.2.1 beschrieben, bestimmt. Es wurden jeweils zwei Meßwerte parallel bestimmt. Die Proteolyse erfolgte nach der Vorinkubation des Enzyms (50 µl) von jeweils 2 Minuten durch Zugabe von 100 - 950 µl Proteasenlösung direkt in dem Glasröhrchen, in dem auch nach Zugabe von Ansatzlösung und Inkubation die Messung erfolgte. Sämtliche Proteolysen wurden bei 30 °C durchgeführt.

\*1 ml Enzym entspricht einer Proteinmenge von 0,325 mg.

#### 3.4.2 Messung der verbliebenen Aktivität des Enzyms nach der Proteolyse

Als Zeitpunkt des Abstoppens der Proteolyse wurde der Punkt der Zugabe der Ansatzlösung angenommen, da das Enzym durch diese Zugabe um das 30-fache verdünnt wurde. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde nach der Zugabe von Mg-ATP die verbliebene Aktivität bestimmt.

#### 3.4.3 Beenden der Proteolyse nach einer bestimmten Zeit

Da außer für Trypsin kein Inaktivator entsprechend dem Trypsininhibitor bekannt war (vergleiche dazu Tab. 2), der neben der Inaktivierung der Proteasen nicht auch das Enzym geschädigt bzw. inaktiviert hätte, wurde bei beiden Untersuchungsmethoden der Zeitpunkt der Zugabe von Ansatzlösung zum Proteolysegemisch als Beendigung der Proteolyse angenommen. Dies scheint gerechtfertigt, da das Reaktionsverhältnis (Enzym zu Protease) durch Zugabe der Ansatzlösung mindestens um den Faktor 100 verdünnt wurde. Diese Abstoppsmethode gilt nur für die Proteasen-Konzentrationen, die höchstens um den Faktor 100 über denjenigen liegen, bei denen kein Effekt mehr nachweisbar war. Darüber ist der Reaktionsablauf stark vermindert.

#### 3.5 Berechnung des Aktivitätsverlustes der Proteasen während der Versuche

Eine Verdünnung der ProteasenstammLösung um den Faktor 1 : 10 bzw. 1 : 100 zeigte, daß durch diesen kein Aktivitätsverlust in der Proteasenwirkung zu erkennen war. Über den langen Zeitraum der Versuche (bis zu 6 Stunden), verloren die eingesetzten Proteasen aller-

dings in geringem Umfang doch an Aktivität (s. Abb. 4, Beispiel an Ficin). Dieser konnte rechnerisch ausgeglichen werden, indem in bestimmten Abständen Kontrollmessungen durchgeführt wurden.

### 3.6 Einfluß von CaM auf die Proteolyse

Da nach erfolgter Proteolyse die verbliebene Aktivität auch durch eine Abspaltung bzw. proteolytische Spaltung des Calmodulins bedingt sein konnte, wurde mit zwei unterschiedlichen Versuchen der Einfluß einer zusätzlichen Zugabe von 10 U CaM zum Meßmedium untersucht, womit eine mögliche Aktivierung nachzuweisen gewesen wäre:

- a) Parallel zu jedem Meßwert bei 3 Minuten (bei den Proteasen Thermolysin, Papain, Nagarse und Ficin) wurde ein Wert bestimmt, dem nach der 3-minütigen Proteolyse gemeinsam mit der Ansatzlösung 10 U Calmodulin zugefügt wurde (vergleiche Abb. 8, 11, 12, 13).
- b) Weiterhin wurde für alle Proteasen, außer für Trypsin, eine Meßreihe durchgeführt, wobei die Proteasekonzentration und das Volumen an Enzym gleich blieben. Die Inkubationszeit wurde allerdings von 10 Minuten auf 20 Minuten erhöht. So war es möglich, 10 U CaM zu unterschiedlichen Zeitpunkten dem Meßmedium (vor der Proteolyse, während der Proteolyse, bzw. während der um 10 Minuten verlängerten Inkubationszeit) zuzufügen (s. Abb. 1).



Abb. 1: Schematische Darstellung des Zeitpunktes der Zugabe von 10 U CaM.

Die Inkubationszeit war gegenüber den sonst durchgeführten Messungen um 10 Minuten verlängert (3). Die Pfeile (↓↓↓↓) entsprechen dem jeweiligen Zeitpunkt der Zugabe von 10 U CaM. Die Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt.

|                                              |        |
|----------------------------------------------|--------|
| 1. Vorinkubationszeit des Enzyms             | 2 min  |
| 2. Proteolysezeit (Enzym plus Protease)      | 5 min  |
| 3. Um 10 Minuten verlängerte Inkubationszeit | 10 min |
| 4. Normale Inkubationszeit                   | 10 min |
| 5. Meßzeit                                   | 7 min  |

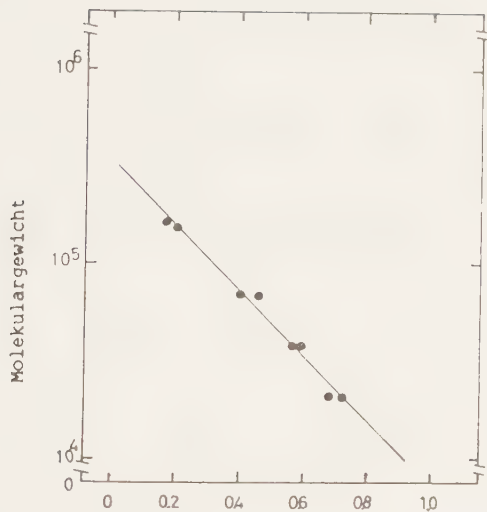
### 3.7 Korrektur der gemessenen Werte

Alle Meßwerte werden als spezifische Aktivität in Prozent angegeben. Bei der konzentrationsabhängigen-zeitgleichen Proteolyse entspricht 100 % immer der spezifischen Aktivität des nicht proteolytisch gespaltenen Enzyms ( $6.353 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein). Dieser Bezugswert - außer bei  $\downarrow$ -Chymotrypsin (Abb. 7) und Ficin (Abb. 13) - ist gleich der Enzymaktivität, die bei einer niedrigen Proteasenkonzentration gemessen wird, bei der keine Proteolyse mehr nachweisbar ist (vergl. Abb. 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Bei der zeitabhängigen-konzentrationsgleichen Proteolyse der Abb. 16 und 19 wurde die spezifische Aktivität des nicht proteolytisch gespaltenen Enzyms ebenfalls als Bezugsgröße gewählt, während in den Abb. 20, 22, 24, 26, 28 die spezifische Aktivität des Enzyms nach 2-5 Sekunden Proteolyse bei einer definierten Proteasenkonzentration 100 % entspricht. Die letztgenannte Bezugsgröße wurde gewählt, um so einen direkten Vergleich mit den der Proteasenkonzentration entsprechenden Gelen zu haben.

### 3.8 Beurteilung der gemessenen Werte mit einem entsprechenden Gelelektropherogramm

Zur Beurteilung der gemessenen Aktivität nach zeitlich begrenzter proteolytischer Spaltung, besonders im Hinblick auf eventuell auftretende größere Peptide, wurde zu jedem Meßwert ein Gelelektropherogramm nach proteolytischer Spaltung angefertigt. Hierzu wurden gleiche Bedingungen wie bei den Messungen angewandt. Es wurden jeweils  $250 \mu\text{l}$  Enzym (entsprechend ca. 0,08 mg Protein) eingesetzt und mit der entsprechenden Men-

ge an Protease versetzt. Beendet wurde die Proteolyse durch Zugabe der doppelten Menge des Enzym/Proteasengemischs an kalter 1 mol/l Trichloressigsäure (TCA). Dieses Gemisch wurde dann auf Eis auf ca. 0 °C abgekühlt. Die durch TCA ausfallenden Proteine bzw. Peptide wurden durch Zentrifugation abgetrennt und dann in ca. 200 µl 320 mmol/l LiDS-Lösung wieder gelöst. Gemeinsam mit ca. 50 µl 2 mol/l Saccharose und dem Marker Pyronin wurde diese Lösung dann auf ein Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter III/2.7 beschrieben. Zur Beurteilung der Spaltprodukte auf ihre Molekulargewichte wurden parallel zu diesen, Eichproteine mit bekanntem Molekulargewicht nach der gleichen Methode vorbehandelt und auf Gele aufgetragen. Mit einer erstellten Eichkurve (s. Abb. 2) konnten dann die Molekulargewichte der unbekannten Peptide bestimmt werden (WEBER & OSBORNE, 1969).



Relative Laufstrecke (Laufstrecke Substanz /  
Laufstrecke Pyronin) bezogen auf die Laufstrecke  
des Pyronins (cm)

Abb.2: Eichkurve zur Feststellung des Molekularge-  
wichtes der Peptide der Gelelektropherogramme

Als Standardproteine wurden RNA-Polymerase (165 000,  
155 000 und 39 000 Dalton), Rinderserumalbumin (68 000  
Dalton) und Trypsininhibitor (21 800 Dalton) verwendet.

4

Ergebnisse

4.1

Stabilität des Enzyms und der eingesetzten Proteasen  
während der Versuche

Die gereinigte CaT unterliegt über einen Zeitraum von 30 Minuten auch bei einer Erwärmung auf 30 °C einem nur unbedeutendem Aktivitätsverlust von etwa 5 %. Im aufgetauten Zustand bei Lagerung auf Eis beträgt der gesamte Aktivitätsverlust des Enzyms nach 360 Minuten ca. 35 %. Das bedeutet, daß auch nach dieser langen Zeit nach dem Auftauen des Enzyms immer noch sehr gut auswertbare Ergebnisse mit dem Enzym erreicht werden können, die rechnerisch auszugleichen sind.

Bei den eingesetzten Proteasen zeigte sich abhängig vom Lösungspuffer über die Zeit der Versuche eine gute Stabilität. Diese wurde über in bestimmten Abständen wiederkehrende gleiche proteolytische Spaltungen nachgewiesen. Von den zur Aktivierung und Stabilisierung der Proteasen zugesetzten Stoffen wurde nur der Einfluß von DTT auf die Aktivität des Enzyms ausgetestet. Für eine Endkonzentration von 2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  (Thermolysin) und 1 mmol/l Mercaptoethanol (Papain) galt als sicher, daß diese keinen Einfluß haben würden. DTT, das bei der höchsten angewandten Ficinkonzentration von 10 mg/ml Enzym auch auf die CaT wirkt, hat bei längerer Einwirkdauer (30 Minuten) einen ganz erheblichen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms (s. Abb. 3), wobei diese durch DTT um fast 25 % erniedrigt wird. Der Trypsininhibitor in einer Endkonzentration von 1 mg im Meßansatz bewirkte eine Aktivierung, die auf ein im Inhibitor vorhandenes ATP-spaltendes Enzym oder freies Phosphat zurückzuführen ist.

Für Nagarse wurde in Konzentrationen von  $> 1$  mg Protease / ml Enzym ein hoher freier Phosphatgehalt festgestellt

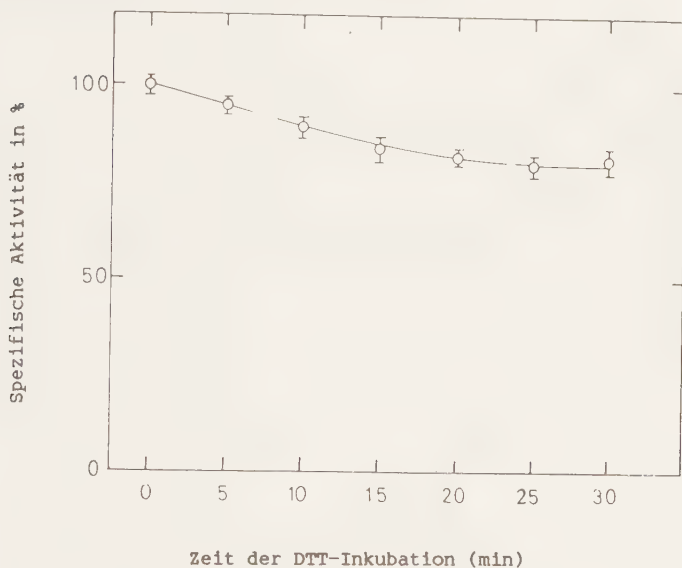
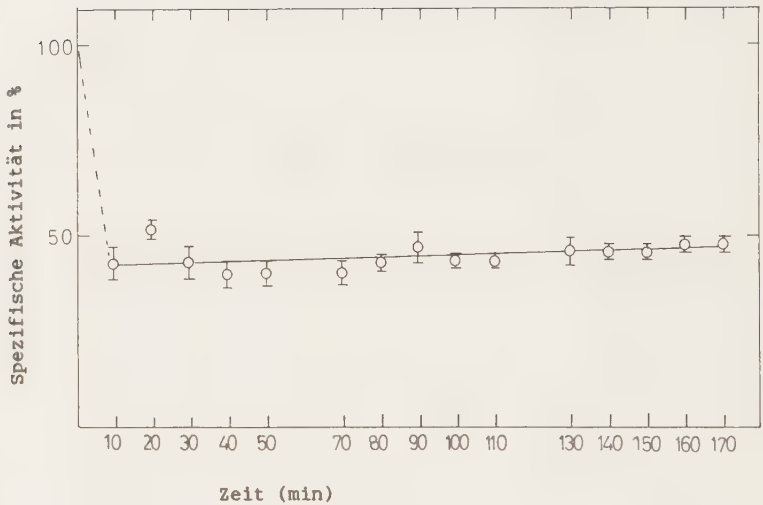


Abb. 3: Der Aktivitätsverlust der CaT bei Vorinkubation mit einem hohen DTT-Gehalt

Die Konzentration an DTT entsprach derjenigen, die bei einer Konzentration von 10 mg Ficin in dem Proteasenlösungsmittel enthalten ist. Nach einer Vorinkubation von 2 Minuten wurde dem Enzym die DTT enthaltende Lösung zugesetzt. Die Einwirkdauer (Inkubationszeit) betrug 0 Minuten bis 30 Minuten bei 30 °C, bevor die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt wurde. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität ( $6.353 \mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des Enzyms (= 100 %) berechnet.



**Abb. 4:** Bestimmung der Stabilität der Protease Ficin in gelöstem Zustand (Puffer II und DTT in einer Konzentration, die 300fach höher war als Ficin) über den Zeitraum von 0 bis 170 Minuten

Bei diesem Kontrollversuch wurde immer die gleiche Menge Enzym nach einer Vorinkubation von 2 Minuten bei 30 °C im Ansatzglas mit ebenfalls immer der gleichen Menge an Ficin (4 mg/ml) versetzt und jeweils 3 Minuten bei 30 °C gespalten. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität ( $6.353 \mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des nicht proteolytisch gespaltenen Enzyms (= 100 %) berechnet.

## 4.2 Ergebnisse der zeitlich begrenzten, konzentrationsabhängigen Proteolyse

### 4.2.1 Trypsin

Der Einfluß einer proteolytischen Spaltung mit Trypsin wurde an zwei verschiedenen Enzymzuständen (nicht aktiviert Abb. 5, aktiviert mit CaM Abb. 6) getestet. Die Proteolyse wurde hier immer mit einer dreifachen Menge an Trypsininhibitor beendet. Zuerst wurde dem Enzym, so wie es von der Säule eluiert worden war (s.III/2.6.2), Trypsin in aufsteigenden Konzentrationen zugefügt. Dann wurden 10 U CaM nach Zugabe des Trypsininhibitors gemeinsam mit der Ansatzlösung zugegeben (s. Abb. 5). Anschließend wurde das im aktiven (10 U CaM, 40  $\mu\text{mol/l}$   $\text{CaCl}_2$ ) Zustand befindliche Enzym in gleicher Weise gespalten wie oben beschrieben (s. Abb. 6). Es zeigte sich, daß bei dem nicht aktivierten Enzym zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-2}$  mg Trypsin/ml Enzym ein zunächst steiler Anstieg der Aktivität erfolgte, der bis etwa  $3 \times 10^{-1}$  mg Trypsin/ml Enzym gleich blieb, dann aber rasch abfiel (s. Abb. 5). Die maximal erreichte Aktivität in Gegenwart von Trypsin lag dabei sogar über dem Wert, der für das Enzym unter Zugabe von 10 U CaM selbst gemessen wurde (s. Abb. 5). Im ansteigenden Teil der Kurve ist die Aktivität calmodulinunabhängig. Für das von Anfang an aktivierte Enzym (s. Abb. 6) wurde dagegen nur ein geringer Anstieg der Aktivität zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-4}$  mg Trypsin/ml Enzym ermittelt. Dieser fiel zunächst langsam bzw. dann schnell im Bereich von  $10^{-2}$  bis  $10^{-1}$  mg Trypsin/ml Enzym ab. Aber auch hier wurde nach der Proteolyse eine Restaktivität gemessen, die über der des nicht gespaltenen Enzyms lag. Bei beiden durchgeführten Versuchen betrug die Proteolyse-dauer 3 Minuten.

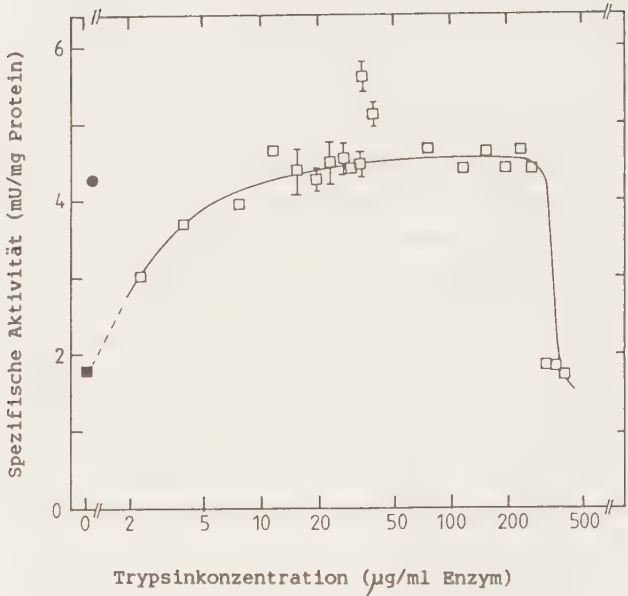


Abb. 5: Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit Trypsin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Das Enzym wurde, so wie es von der CaM-Affinity-Säule (CaM-frei,  $\text{Ca}^{2+}$ -arm) eluiert wurde, mit aufsteigenden Konzentrationen an Trypsin 3 Minuten bei 30 °C gespalten. Mit einer 3-fachen Konzentration an Trypsin-inhibitor wurde die Proteolyse abgestoppt. Nach Zugabe von Ansatzlösung gemeinsam mit 10 U CaM wurde nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt (□). (■ = Basalaktivität der CaT; ● = mit 10 U CaM aktivierte CaT)

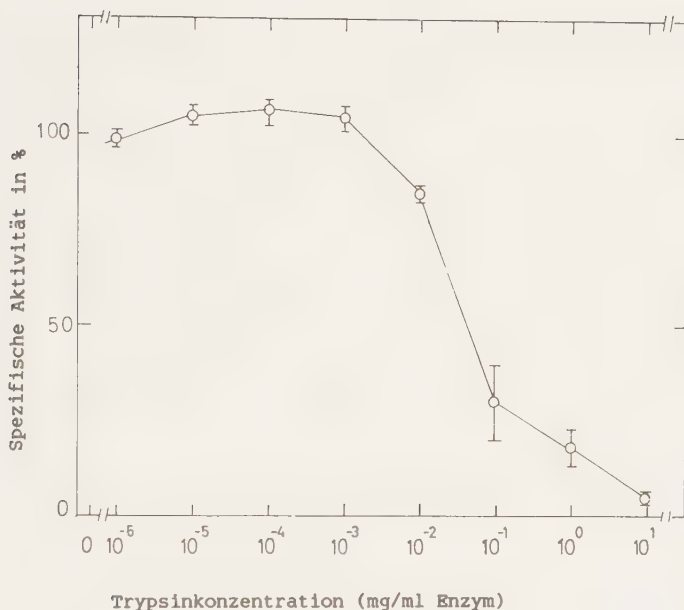


Abb. 6: Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit Trypsin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Bei diesem Versuch lag die CaT in aktiviertem Zustand (CaM gesättigt und optimaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) vor. Der Versuchsablauf entsprach dem von Abb. 5. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität ( $6.353 \mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

#### 4.2.2 $\alpha$ -Chymotrypsin

Eine konzentrationsabhängige Proteolyse der gereinigten, aktivierten CaT von 3 Minuten mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (gelöst in Puffer I) zeigte einen ähnlichen Verlauf (s. Abb. 7) in niedriger Konzentration wie bei der Proteolyse mit Trypsin. Zunächst erfolgte ein geringfügiger Anstieg bzw. Abfall (zwischen  $10^{-3}$  und  $10^0$  mg Protease/ml Enzym), um dann doch relativ rasch unter 15 % verbleibende Aktivität (zwischen  $4 \times 10^0$  und  $2 \times 10^1$  mg Protease/ml Enzym) abzufallen. Der höchste nach Proteolyse erhaltene Wert lag unter dem Wert, der für das nicht gespaltene Enzym (= 100 %) gemessen wurde (vgl. Abb. 7). Deutlicher sichtbar ist dieser Anstieg der Aktivität durch Proteolyse mit  $\alpha$ -Chymotrypsin in Abb. 19. Dort zeigt sich bei gleicher Konzentration an Protease (gelöst in Puffer I), aber unterschiedlich langer Proteolysedauer, ebenfalls ein Anstieg der verbliebenen Aktivität, mit Höhepunkt bei 12 - 13 Minuten Proteolysezeit und verringert sich dann wieder.

#### 4.2.3 Thermolysin

Thermolysin zeigte nur bei Verwendung von Puffer II unter Zusatz von 2 mmol  $\text{CaCl}_2$  eine über den Versuchszeitraum gute Stabilität. Für die beiden Messungen (2-5 Sekunden und 3 Minuten) ergibt sich zwischen  $10^{-1}$  und  $4 \times 10^0$  mg Protease/ml Enzym ein nahezu paralleler Verlauf (s. Abb. 8). In einer Konzentration  $>10^{-3}$  mg/ml Enzym entsprachen die gemessenen Werte den Werten des nicht gespaltenen Enzyms (s. Abb. 8). Eine Aktivierung bei geringer Konzentration an Protease war nicht zu beobachten.

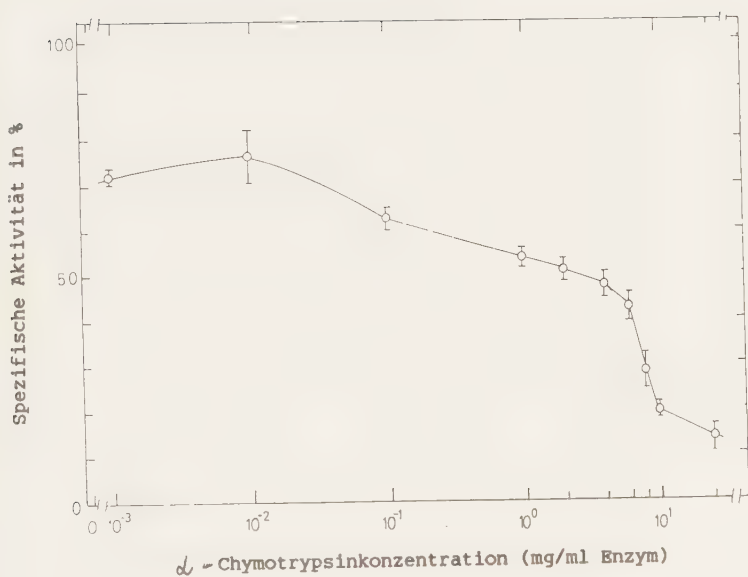
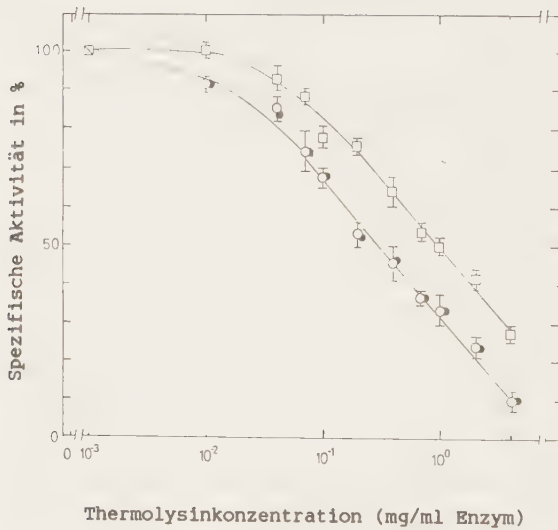


Abb. 7: Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit  $\alpha$ -Chymotrypsin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag bei diesem Versuch aktiviert (CaM-gesättigt, mit optimaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) vor,  $\alpha$ -Chymotrypsin war in Puffer I gelöst. Die Proteolysezeit betrug jeweils 3 Minuten bei 30 °C. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität ( $6.353 \mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.



**Abb. 8:** Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit Thermolysin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag bei diesem Versuch aktiviert vor. Thermolysin war in Puffer II unter Zusatz von 2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$  gelöst. Die Proteolysezeit betrug beim Kontrollwert 2-5 Sekunden (□), 3 Minuten (○) und 3 Minuten (●) unter Zusatz von 10 U CaM bei 30 °C. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität ( $6.353 \mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

#### 4.2.4 Papain

Papain zeigte bei Verwendung der beiden verschiedenen Puffer I und II auch unterschiedliche Ergebnisse (s. Tabelle 3).

Über einen längeren Versuchsverlauf konnte mit Puffer I zwar keine ausreichende Stabilität der Protease erhalten werden, es ergab sich aber bei kurzer Verwendungsdauer doch ein interessanter Effekt. Es konnte eine geringgradige Aktivierung der CaT bei unterschiedlichen Konzentrationen der Protease, aber einer auf 5 Minuten begrenzten Proteolyse, gezeigt werden (s. Abb. 9). Dieses konnte noch durch einen weiteren Versuch bestätigt werden (s. Abb. 10), es wurden im Bereich von  $10^{-3}$  bis  $10^{-1}$  mg Protease/ml Enzym drei verschiedene Meßzeiten (1 Minute, 2 Minuten und 5 Minuten) bestimmt. Bei allen drei Kurven ist im Bereich von  $10^{-2}$  mg Protease/ml Enzym eine statistisch allerdings nicht signifikante Aktivierung gegenüber dem vorhergehenden Wert zu erkennen, der für die 1- und 2-minütige Einwirkdauer sogar über dem Wert des unbehandelten Enzyms liegt. Letzteres gilt auch für die beiden niedrigsten Konzentrationen in Abb. 9. Der vollständige Verlust jeglicher Aktivität wurde bei der konzentrationsabhängigen Proteolyse (Abb. 10) für alle drei Proteolysezeiten bei  $10^1$  mg Protease/ml Enzym gemessen.

Wenn Papain in Puffer II unter Zusatz von 1 mmol/l ME gelöst wurde, ergab sich folgendes Ergebnis: Der Kontrollwert und 3 Minuten-Wert treffen sich bei  $10^{-3}$  mg Protease/ml Enzym, ohne dabei über den Wert des nicht gespaltenen Enzyms zu gelangen (Abb. 11). Bei einer Konzentration von  $10^1$  mg Protease/ml Enzym war nach einer Proteolysedauer von 3 Minuten die verbliebene Aktivität auch annähernd 0, wie es auch für Puffer I ermittelt wurde. Eine Aktivierung im

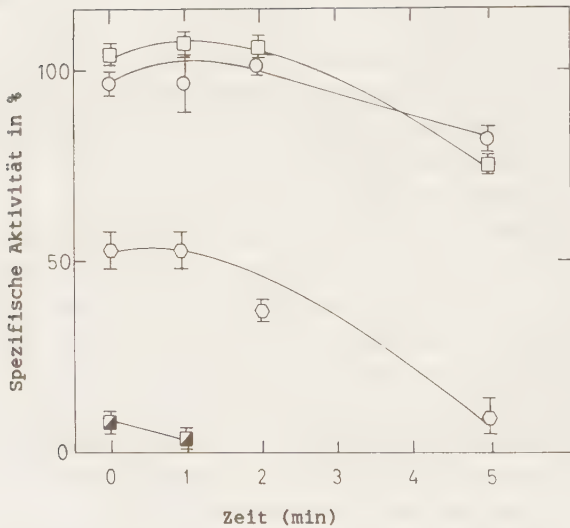


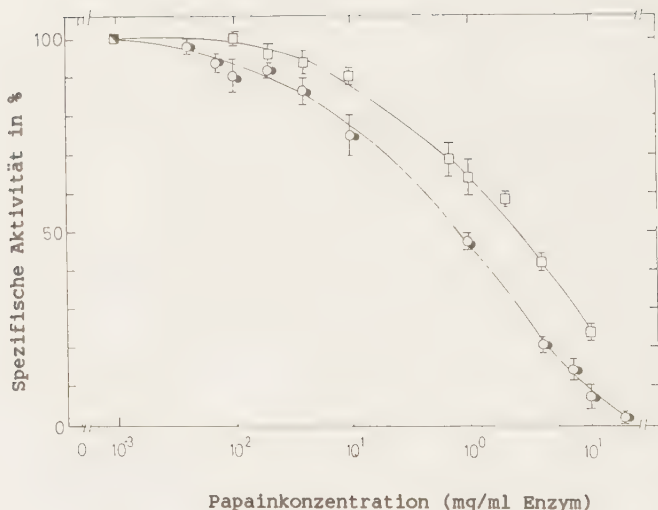
Abb. 9: Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit Papain auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag bei diesem Versuch aktiviert vor, Papain war in Puffer I gelöst. Die Proteolyse erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen (■ = 10 mg Papain/ml, ⬡ = 1 mg Papain/ml, ○ = 0.1 mg Papain/ml, □ = 0.01 mg Papain/ml und unterschiedlichen Proteolysezeiten (zwischen 2-5 Sekunden [entspricht Ø] und 5 Minuten) bei 30 °C. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität (6.353  $\mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.



Abb. 10: Einfluß einer konzentrations- und zeitabhängigen Proteolyse mit Papain auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Papain war in Puffer I gelöst, die Proteolysezeit betrug 1 Minuten (□), 2 Minuten (○) und 5 Minuten (⬡) bei 30 °C. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität (6.353  $\mu\text{mol/min/mg}$  Protein) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.



**Abb. 11:** Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit Papain auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag bei diesem Versuch aktiviert vor, Papain war unter Zusatz von 1 mmol/l ME in Puffer II gelöst. Die Proteolysezeit betrug 2-5 Sekunden beim Kontrollwert (□), 3 Minuten (○) und 3 Minuten (●) unter Zusatz von 10 U CaM bei 30 °C. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität (6.353  $\mu\text{mol/min/mg}$  Protein) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

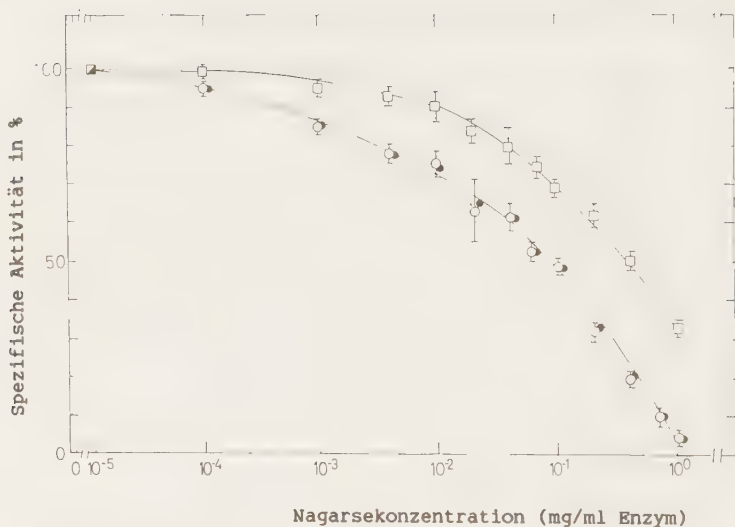
niedrigen Konzentrationsbereich konnte allerdings nicht gefunden werden.

#### 4.2.5 Nagarse

Nagarse ist bereits in wesentlich geringerer Konzentration wirksam als alle anderen untersuchten Proteasen. Bei  $10^{-5}$  mg Protease/ml Enzym ist für den Kontrollwert und den 3 Minuten-Wert eine Proteolyse nicht mehr nachweisbar, es konnte auch keine Aktivierung über den Wert des nicht gespaltenen Enzyms erreicht werden. Zwischen  $4 \times 10^{-3}$  und  $10^0$  mg Protease/ml Enzym zeigt sich ein annähernd paralleler Kurvenverlauf (s. Abb.12). Nagarse zeigte nur bei Lösen in Puffer II eine ausreichende Stabilität.

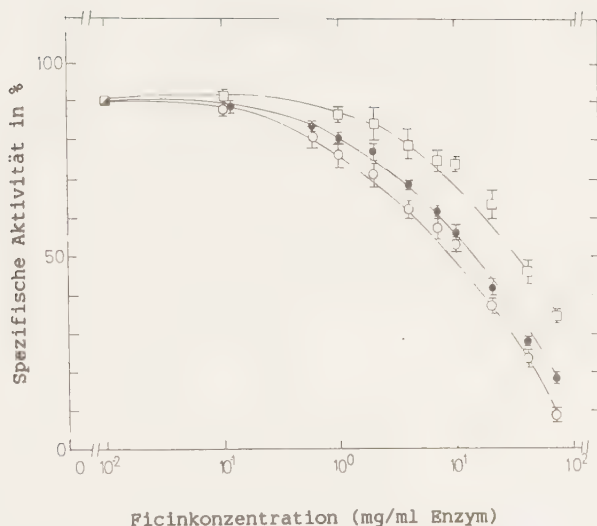
#### 4.2.6 Ficin

Ficin zeigte nur in Puffer II unter Zusatz von einer 300-fachen molaren Konzentration an DTT im Verhältnis zur Proteasekonzentration ausreichende Stabilität. Im Bereich  $10^{-2}$  mg Protease/ml Enzym treffen sich die beiden Meßpunkte : Kontrollwert und 3 Minutenwert. Dieser Wert liegt dabei allerdings unter dem Wert, der für das nicht gespaltene Enzym gefunden wurde. Ficin ist wirksam von  $10^{-1}$  -  $10^2$  mg Protease/ml Enzym. Die beiden Werte, Kontrollwert und 3 Minutenwert zeigen einen steilen parallelen Kurvenverlauf zwischen  $2 \times 10^0$  und  $10^2$  mg Protease/ml Enzym. Im niederen Konzentrationsbereich ( $< 2 \times 10^0$  mg Protease/ml Enzym) kommt es zu einer Annäherung der Werte (s. Abb. 13).



**Abb. 12:** Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit Nagarse auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag bei diesem Versuch aktiviert vor, Nagarse war in Puffer II gelöst. Die Proteolysezeit betrug 2-5 Sekunden beim Kontrollwert (□), 3 Minuten (○) und 3 Minuten (●) mit Zusatz von 10 U CaM bei 30 °C. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität (6.353  $\mu\text{mol/min/mg}$  Protein) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

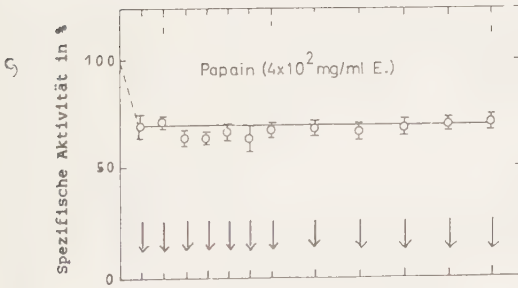
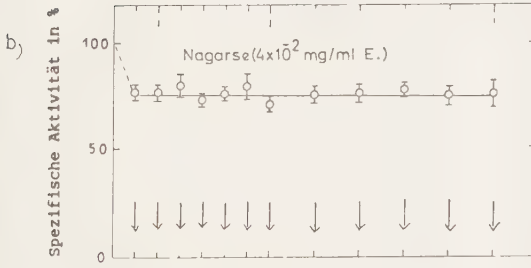
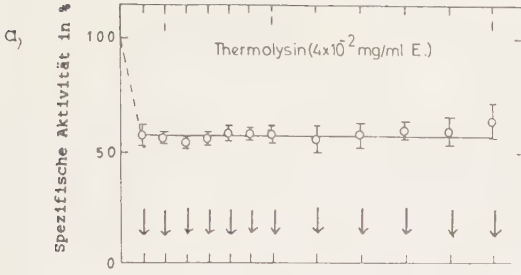


**Abb. 13:** Einfluß einer konzentrationsabhängigen Proteolyse mit Ficin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

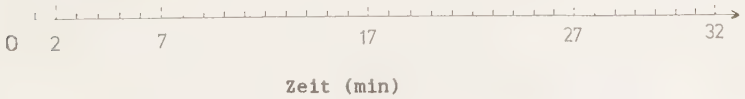
Die CaT lag bei diesem Versuch aktiviert vor, Ficin war in Puffer II gelöst unter Zusatz einer jeweils 300-fachen molaren Konzentration an DTT. Die Proteolysezeit betrug 2-5 Sekunden beim Kontrollwert (□), 3 Minuten (○) und 3 Minuten (●) unter Zusatz von 10 U CaM bei 30 °C. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität (6.353  $\mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

#### 4.3 Der Einfluß von Calmodulin auf das proteolytisch gespaltene Enzym

Außer bei der Proteolyse mit Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde CaM bei der konzentrationsabhängigen Proteolyse bei allen anderen Proteasen nach einer 3-minütigen Proteolyse gemeinsam mit der Ansatzlösung zugesetzt. Diese Werte wurden zusätzlich zu einem Kontrollwert (2-5 Sekunden Proteolysezeit) und 3 Minuten-Wert bestimmt. Nur bei der Proteolyse mit Ficin konnte eine leichte Aktivierung durch 10 U CaM über die Werte erreicht werden, die jeweils bei einer Proteolysedauer von 3 Minuten gemessen wurden. Die Aktivierung war zwar gering, aber konstant über den gesamten Meßbereich zu sehen (s. Abb. 13) und steht in Einklang mit den Ergebnissen der Abb. 14, wo 10 U CaM zu unterschiedlichen Zeitpunkten (s. III/3.6) dazugeben wurden. Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit von 10 Minuten auf 20 Minuten konnte bei keiner der Proteasen bei gleichlanger Proteolysedauer und gleicher Proteasenkonzentration durch Zugabe von 10 U CaM zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Aktivierung nachgewiesen werden, außer bei Ficin (vgl. auch Abb. 1 mit Abb. 14), wo ein nicht signifikanter Anstieg der Aktivität um 5 % gezeigt werden konnte.



|               |            |                                                     |
|---------------|------------|-----------------------------------------------------|
| Vorinkubation | Proteolyse | um 10 min verlängerte Ink. = normale Ink. + Meßzeit |
|---------------|------------|-----------------------------------------------------|



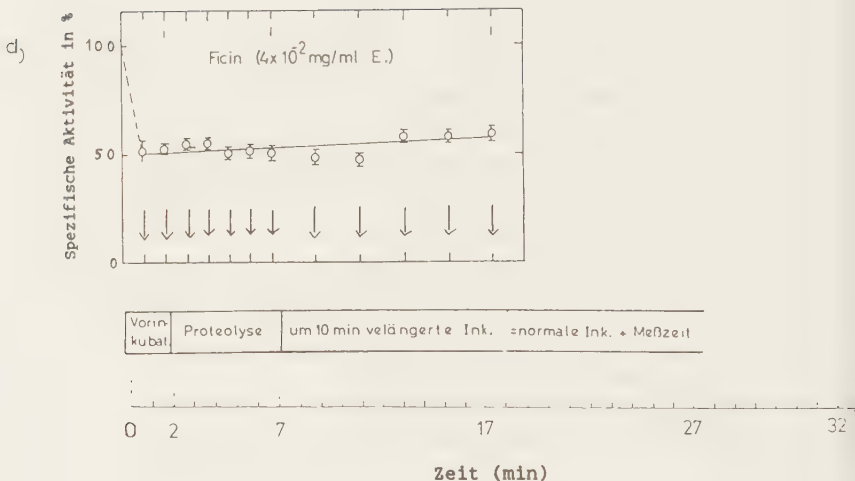


Abb. 14 a - d: Wirkung von Calmodulin auf die Aktivität der CaT, die mit verschiedenen Proteasen gespalten wurde (vergleiche zu dieser Abbildung auch Abbildung 1)

In dieser Abbildung sind vier Diagramme, entsprechend den vier Proteasen (Thermolysin, Papain, Nagarse, Ficin) dargestellt. Die jeweilige Konzentration an Protease war immer die gleiche ( $4 \times 10^{-2}$  mg/ml), die Proteolysezeit betrug immer 3 Minuten bei 30 °C. Die einzige Variable war der Zeitpunkt der Zugabe von 10 U Calmodulin (↓↓↓↓). Die verbliebene Aktivität wurde (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität ( $6.353 \mu\text{mol/min/mg}$  Protein) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

#### 4.4 Vergleich der Gelelektropherogramme mit den entsprechenden Messungen

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden durchgeführt, um die gemessenen Werte mit den Ergebnissen von CARAFOLI und ZURINI (1982) vergleichen zu können und zur besseren Beurteilung der eigenen Ergebnisse (s. III/4.2.1; 4.2.6).

Bei den in diesem Kapitel beschriebenen Versuchen wurde nur Enzym von hoher Reinheit verwendet (Abb. 15). Die Messung der verbliebenen Aktivität nach Proteolyse erfolgte bei 30 °C und den gleichen Bedingungen, wie unter III/2.8 beschrieben. Die Proteolyse-dauer wurde bei konstanter Proteasekonzentration variiert. Die Proteolysen für die Gelelektropherogramme wurden entsprechend den Messungen durchgeführt, allerdings wurde eine größere Menge des Enzyms eingesetzt (250 µl). Die Reaktion wurde durch Zugabe des 3-fachen Volumen an 1 mol/l TCA abgestoppt. Die weiteren Methoden für die Gelelektrophorese wurden bereits beschrieben (s. III/2.7 und 3.8). Als Standardkurve diente die in Abb. 2 abgebildete Eichkurve.

##### 4.4.1 Trypsin

In Abb. 16 sind zwei verschiedene zeitabhängige Proteolysen ( $10^{-3}$  mg Protease/ml Enzym) zusammengefaßt. Einerseits mit Abstoppen der Proteolyse mit Trypsininhibitor (○), andererseits ohne Inaktivator (□). Dabei zeigt sich für (○) ein leichter Anstieg der Aktivität bis zu 3 Minuten, gefolgt von einem leichten Abfall bis 9 Minuten. Ohne Inaktivator (□) fällt die Aktivität zwischen 0 und 1 Minute Proteolysedauer um 30 % ab, um dann ebenfalls leicht anzusteigen und erst nach einer Proteolysedauer von 5 Minuten leicht abzufallen. Als Lösungsmittel wurde immer Puffer I eingesetzt.

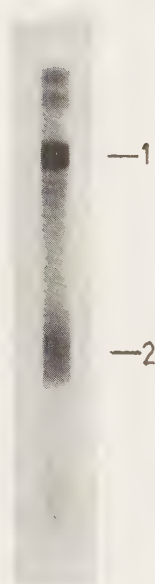


Abb. 15: Gereinigte CaT der Humanerythrocyten.  
(ca. 80  $\mu$ g Protein)

Die CaT war nach Elution von der CaM-Affinitätsäule mit optimaler Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und CaM versetzt worden und dann bei  $-196^\circ\text{C}$  eingefroren worden. Bei 140 000 - 150 000 Dalton (1) zeigt sich eine Bande für das Enzym und bei ca. 16 000 - 18 000 Dalton für Calmodulin (2).

Der Vergleich mit dem Gelelektropherogramm zeigt bei einer Proteolysedauer von 3 Minuten und einer höheren Konzentration von  $10^{-2}$  mg Trypsin/ml Enzym eindeutig drei Banden (Abb. 17), deren Molekulargewicht mit 140 000 bis 150 000, 115 000 bis 125 000 und 65 000 bis 70 000 Dalton bestimmt werden konnten. Bei 90 000 Dalton ist keine Bande vorhanden. Bei Verwendung einer niedrigeren Konzentration an Protease, nämlich  $3 \times 10^{-3}$  mg Trypsin/ml Enzym (s. Abb. 18) treten mehrere breite Banden auf, deren Molekulargewicht mit 140 000 bis 150 000, 125 000, 105 000, 90 000 bis 100 000 und 68 000 Dalton bestimmt werden konnten. Im hohen Molekulargewichtsbereich traten noch Banden auf, bedingt durch mehrmaliges Einfrieren, aber auch solche mit geringerem Molekulargewicht, z.B. Calmodulin und Trypsininhibitor und deren Spaltprodukte.

#### 4.4.2 $\Delta$ -Chymotrypsin

Zur Bestimmung der verbliebenen Aktivität nach proteolytischer Spaltung mit  $\Delta$ -Chymotrypsin wurden beide Puffer (I und II) verwendet. Dabei ergab sich bei Verwendung von Puffer I und einer Konzentration von 6 mg Protease/ml Enzym eine Restaktivität von 43 % (bei einer Proteolysedauer von 3 Minuten) und bis zu 64 % (bei einer Proteolysedauer von 12 Minuten), um dann wieder auf unter 40 % der Ausgangsaktivität abzusinken (bei einer Proteolysedauer von 25 Minuten) (s. Abb. 19). Dies konnte auch bei Verwendung von 1 mg Protease/ml Enzym gezeigt werden.

Für Puffer II ergibt sich bei einer Konzentration von 4 mg Protease/ml Enzym bis zu einer Proteolysedauer von 15 Minuten ein stetiger Abfall der verbliebenen Aktivität auf etwa 40 %, um dann bei einer Proteolysedauer von 30 Minuten langsam wieder auf 56 %

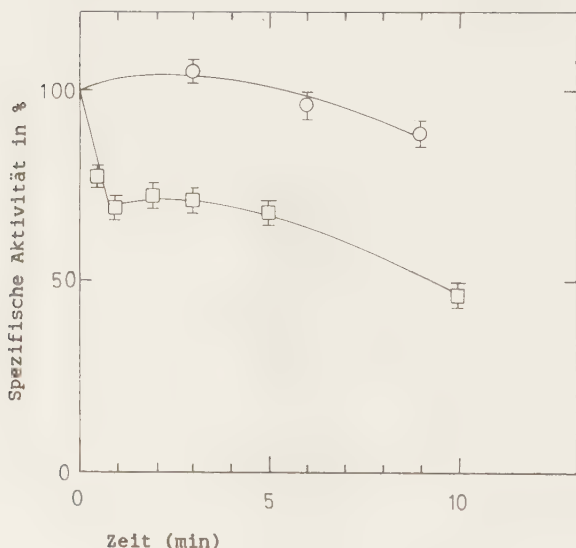


Abb. 16: Ergebnis verschieden langer Einwirkzeiten der Protease Trypsin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag bei beiden Versuchen aktiviert vor. Trypsin war in Puffer II gelöst und wurde in einer Konzentration von  $10^{-3}$  mg/ml eingesetzt. (○) gibt den Verlauf der verbliebenen Aktivität nach Abstoppen der Reaktion mit einer 3-fachen Konzentration an Trypsin-inhibitor wieder und (□) den Verlauf ohne Abstoppen. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität (6.353  $\mu\text{mol/min/mg}$  Protein) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

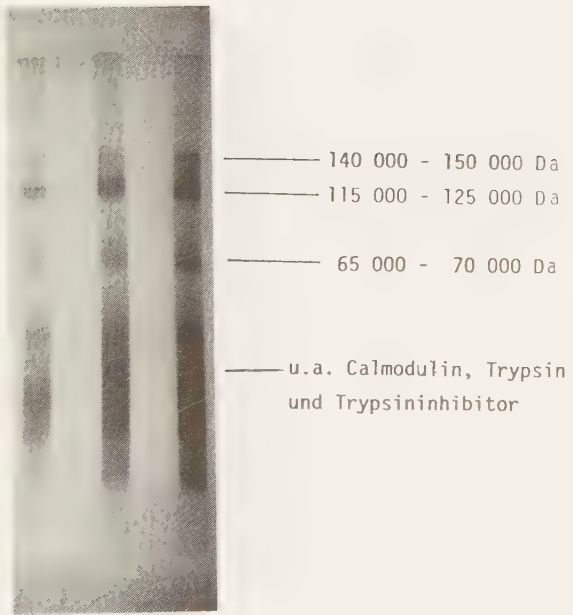


Abb. 17: Gelelektropherogramm der proteolytischen Spaltung der CaT mit Trypsin

Die Konzentration an Trypsin betrug  $10^{-2}$  mg Trypsin/ml Enzym. Die Proteolyse wurde nach 3 Minuten mit der 3-fachen Menge an Trypsininhibitor abgestoppt. Zur Ausfällung der Peptide und Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7. Je Gel wurden ca.  $80\text{ }\mu\text{g}$  CaT-Protein und  $2.5\text{ }\mu\text{g}$  Trypsin aufgetragen.

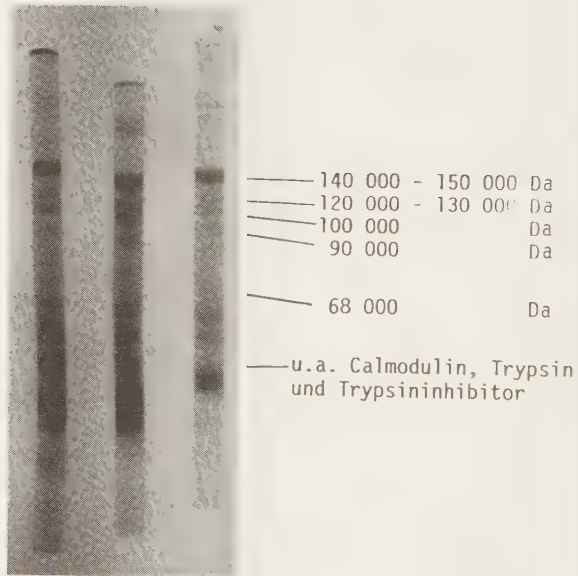


Abb. 18: Gelelektropherogramm der proteolytischen Spaltung der CaT mit Trypsin.

Die Konzentration an Trypsin betrug  $3 \times 10^{-3}$  mg Trypsin/ml Enzym. Die Proteolyse wurde bei 30 °C durchgeführt und nach 3 Minuten mit der 3fachen Menge an Trypsininhibitor abgestoppt. Zur Ausfällung der Peptide und Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7. Je Gel wurden ca. 80 µg CaT-Protein und 0.75 µg Trypsin aufgetragen.

der Ausgangsaktivität anzusteigen (s. Abb. 20).

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Peptide nach proteolytischer Spaltung wurden zwei verschiedene Konzentrationen eingesetzt, 4 mg und 7 mg  $\alpha$ -Chymotrypsin/ml Enzym. Puffer II wurde als Lösungsmittel für die Protease eingesetzt. Es konnte bei beiden Konzentrationen nur ein zeitlicher, kontinuierlicher Abbau der Bande bei 140 000 (nicht sichtbar) Dalton festgestellt werden. Damit ergibt sich kein Anhaltspunkt dafür, daß der Anstieg der Aktivität zwischen 15 und 30 Minuten (s. Abb. 21) durch ein Peptid entsteht, das wie von CARAFOLI et al. (1982) beschrieben, diesen Anstieg erklären könnte.

#### 4.4.3 Thermolysin

Die hier beschriebenen Versuche wurden nur unter Verwendung von Puffer II (mit 2 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ ) durchgeführt. Bei 4 mg Protease/ml Enzym ist nach 10 Minuten die verbliebene Aktivität auf 40 % der Ausgangsaktivität abgefallen. Bei 1 mg Protease/ml Enzym wird dieser Wert erst nach 20 Minuten erreicht. Bei beiden Messungen vermindert sich die verbliebene Aktivität weiterhin (s. Abb. 22). Im Gelelektropherogramm, das nur für 1 mg Protease/ml Enzym gezeigt wird (s. Abb. 23), läßt sich ein kontinuierlicher Abbau der Bande bei 140 000 Dalton zeigen, ohne daß eine Anhäufung kleinerer Peptide zu sehen wäre. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei einer Verwendung von Puffer I als Lösungsmittel.

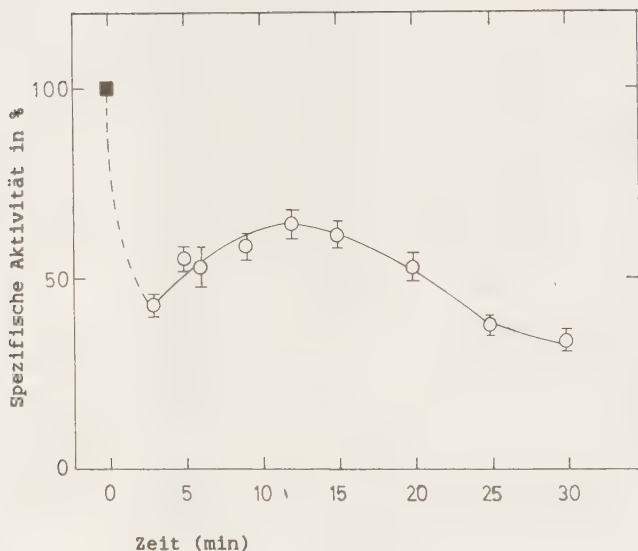


Abb. 19: Ergebnis verschieden langer Einwirkzeiten der Protease  $\alpha$ -Chymotrypsin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag aktiviert vor.  $\alpha$ -Chymotrypsin war in Puffer I gelöst und wurde in einer Konzentration von 6 mg/ml eingesetzt. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die spezifische Aktivität ( $6.353 \mu\text{mol/min/mg Protein}$ ) des nicht gespaltenen Enzyms (= 100 %) bezogen.

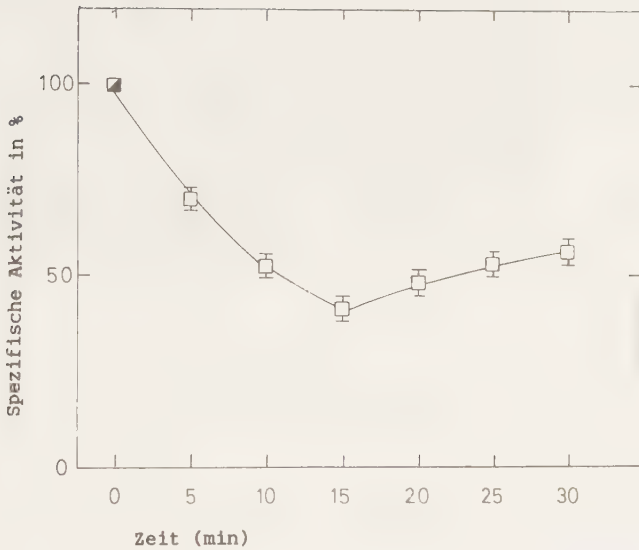


Abb. 20: Ergebnis verschieden langer Einwirkzeiten der Protease  $\alpha$ -Chymotrypsin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag aktiviert vor.  $\alpha$ -Chymotrypsin war in Puffer II gelöst und wurde in einer Konzentration von 4 mg/ml eingesetzt. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die bei 0 Minuten (entsprechend 2-5 Sekunden Proteolyse) angegebene spezifische Aktivität von  $5.974 \mu\text{mol/min/mg Protein}$  (= 100 %) bezogen.

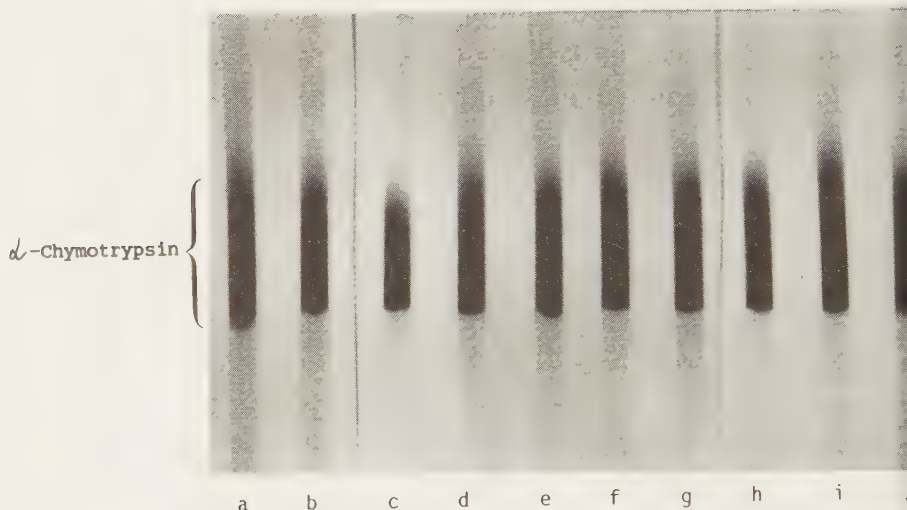


Abb. 21: Gelelektropherogramme der proteolytischen Spaltung der CaT der Humanerythrocyten mit *L*-Chymotrypsin

Die Konzentration an *L*-Chymotrypsin betrug immer 4 mg *L*-Chymotrypsin/ml. Die Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt; die Proteolysezeiten waren verschieden lang (zwischen 2-5 Sekunden und 30 Minuten). Die Reaktion wurde nach der entsprechenden Proteolysezeit durch Zugabe des doppelten Volumens an 1 mol/l TCA und zwar mit einem Volumen, das doppelt so groß war wie der Reaktionseinsatz, abgestoppt. Je Gel wurden ca. 80 µg CaT-Protein und 1 mg *L*-Chymotrypsin aufgetragen. Proteolysezeiten:

a. 2-5 Sekunden; b. 1 Minute; c. 2 Minuten; d. 3 Minuten; e. 5 Minuten; f. 10 Minuten; g. 15 Minuten; h. 20 Minuten; i. 25 Minuten; j. 30 Minuten

Zur weiteren Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7.

#### 4.4.4 Papain

Papain wurde in Puffer I und II unter Zusatz von 1 mmol/l ME gelöst. Für Puffer I konnte für die drei Konzentrationen  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  und  $10^0$  mg Protease/ml Enzym bei einer Proteolysedauer von 0 Minuten ( $\hat{=}$  2-5 Sekunden) bis 2 Minuten ein leichter Anstieg, gefolgt von einem mehr oder weniger starken Abfall der Aktivität, gezeigt werden (s. Abb. 9). Nach einer Proteolysedauer von 5 Minuten lag der jeweils gemessene Wert für die verbliebene Aktivität für die drei Konzentrationen deutlich unter dem Wert, der bei 0, 1 und 2 Minuten bestimmt wurde. Ein Anstieg der Aktivität konnte auch im Bereich zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  mg Protease/ml Enzym bei unterschiedlich langer Einwirkdauer (s. Abb. 10) gezeigt werden. Bei Verwendung von Puffer II konnte ein Anstieg der verbliebenen Aktivität nicht gezeigt werden (s. Abb. 24). Die Proteasenkonzentration betrug 1 mg pro ml Enzym. Hier wurde im Bereich zwischen 0 und 5 Minuten kein Wert ermittelt.

Im Gelelektropherogramm wurde dann aber für beide Puffer das gleiche Bild gefunden. Es erfolgte ein Abbau der Bande bei 140 000 Dalton; wobei bei ca. 100 000 Dalton eine deutliche Bande entstand, die erst nach Abbau der Bande mit höherem Molekulargewicht (140 000 Dalton) auch verschwand (s. Abb. 25). Aus dem Gelelektropherogramm ist ersichtlich, daß nach 3 Minuten die Bande bei 100 000 Dalton nur noch als Spur vorhanden ist.

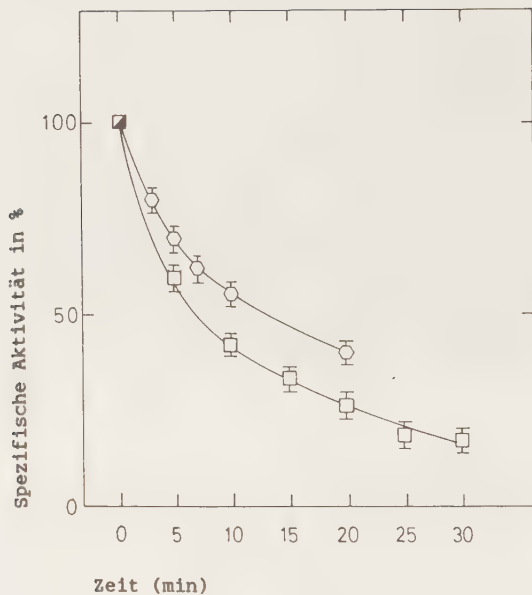


Abb. 22: Ergebnis verschieden langer Einwirkzeiten der Protease Thermolysin auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag aktiviert vor, Thermolysin war in Puffer II gelöst und wurde in den Konzentrationen 1 mg/ml ( $\circ$ ) und 4 mg/ml ( $\square$ ) verwendet. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die bei 0 Minuten (entsprechend 2-5 Sekunden Proteolyse) angegebene spezifischen Aktivität von  $6.182 \mu\text{mol/min/mg}$  Protein (1 mg Thermolysin/ml) bzw.  $3.700 \mu\text{mol/min/mg}$  Protein (4 mg Thermolysin/ml) (= 100 %) berechnet.

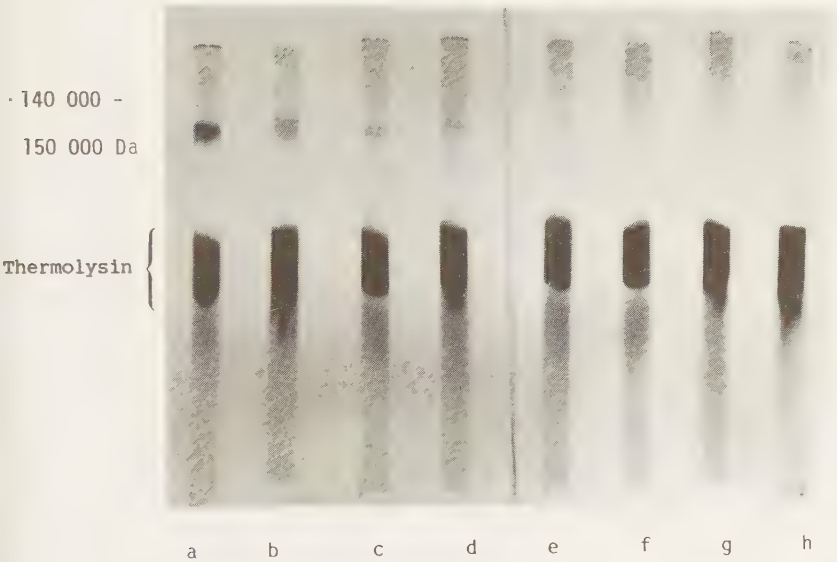


Abb. 23: Gelelektropherogramme der proteolytischen Spaltung der CaT der Humanerythrocyten mit Thermolysin

Die Konzentration an Thermolysin betrug immer 1 mg/ml, die Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Proteolysezeiten wurden zwischen 2-5 Sekunden und 30 Minuten variiert. Nach der entsprechenden Proteolysezeit wurde die Reaktion mit dem doppelten Volumen des Reaktionsansatzes an 1 mol/l TCA abgestoppt. Je Gel wurden ca. 80 µg CaT-Protein und 0.25 mg Thermolysin aufgetragen.

Proteolysezeiten:

a. 2-5 Sekunden; b. 5 Minuten; c. 10 Minuten; d. 15 Minuten; e. 20 Minuten; f. 25 Minuten; g. 30 Minuten; h. Thermolysinstandard 1 mg Protease/ml Lösungsmittel. Zur weiteren Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7.

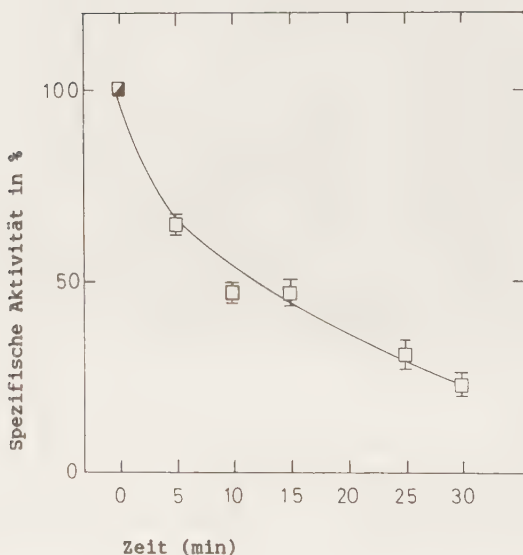


Abb. 24: Ergebnis verschieden langer Einwirkzeiten der Protease Papain auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag aktiviert vor. Papain war in Puffer II gelöst und wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die bei 0 Minuten (entsprechend 2-5 Sekunden Proteolyse) angegebene spezifische Aktivität von  $5.420 \mu\text{mol/min/mg Protein}$  (= 100 %) bezogen.

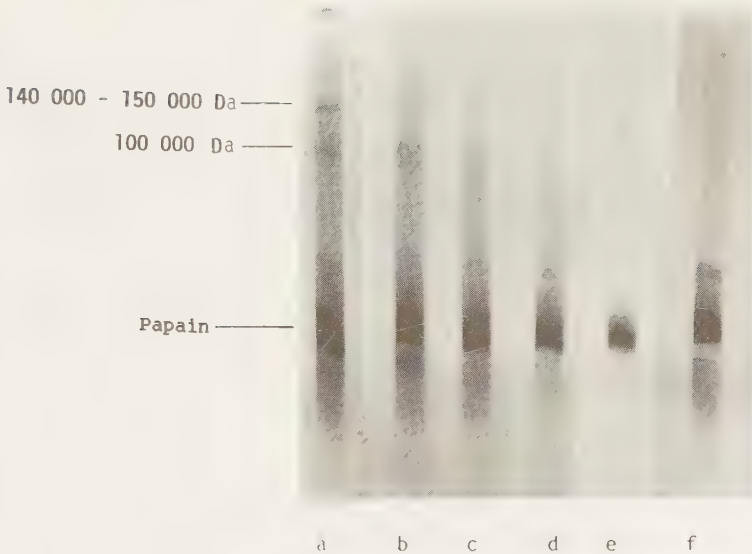


Abb. 25: Gelelektropherogramme der proteolytischen Spaltung der CaT der Humanerythrocyten mit Papain

Die Konzentration an Papain betrug immer 1 mg/ml, die Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Proteolysezeiten wurden zwischen 1 Minuten und 10 Minuten variiert. Nach der entsprechenden Proteolysezeit wurde die Reaktion mit dem doppelten Volumen des Reaktionsansatzes an 1 mol/l TCA abgestoppt. Je Gel werden ca. 80 µg CaT-Protein und 0.25 mg Papain aufgetragen.

Proteolysezeiten:

a. 1 Minute; b. 2 Minuten; c. 3 Minuten; d. 5 Minuten; e. 10 Minuten; f. Papainstandard 1 mg Protease/ml Lösungsmittel. Zur weiteren Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7.

#### 4.4.5 Nagarse

Die Proteolyse mit Nagarse (gelöst in Puffer II) zeigt bei einer Konzentration von  $4 \times 10^{-2}$  mg Protease/ml Enzym einen zunächst steilen (bis 5 Minuten) Abfall und dann einen flacheren Verlauf. Nach 30 Minuten ist noch eine Restaktivität von 30 % der Ausgangsaktivität vorhanden (s. Abb. 26).

Im entsprechenden Gelelektropherogramm konnte nach einer Proteolysedauer von nur 1 Minute keine Bande im Bereich um 140 000 Dalton mehr gefunden werden (s. Abb. 27).

#### 4.4.6 Ficin

Die zeitabhängige Proteolyse mit Ficin (gelöst in Puffer II mit einer 300-fachen Konzentration an DTT) zeigt bei 1 mg Protease/ml Enzym einen relativ flachen Verlauf. Nach ca. 24 Minuten beträgt die Restaktivität 50 %; dieser Wert wird bei 4 mg Protease/ml Enzym bereits nach ca. 5 Minuten erreicht (s. Abb. 28). Diese Ergebnisse werden durch die Ergebnisse der Abb. 29 und 30 bestätigt. Mit 4 mg Protease/ml Enzym ist nach 15 Minuten gegenüber dem 2-5 Sekunden-Wert die Bande bei 140 000 Dalton restlos verschwunden (s. Abb. 30). Mit 1 mg Protease/ml Enzym erscheint die Bande bei 140 000 Dalton nach 5 Minuten zunächst aufgelockert (s. Abb. 29), um auch dann nach einer Proteolysedauer von 20 Minuten nur noch als Spur nachweisbar zu sein. Ohne Zusatz von DTT zum Puffer scheint die Protease Ficin eine etwas größere Wirksamkeit zu haben (keine Abbildung), da hier nach 20 Minuten Proteolysedauer die Bande um 140 000 Dalton bereits vollständig verschwunden ist.

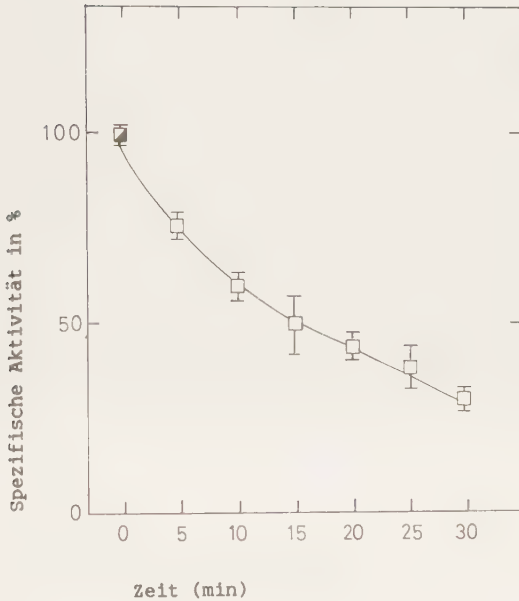


Abb. 26: Ergebnis verschieden langer Einwirkzeiten der Protease Nagarse auf die Aktivität der CaT der Humanerythrocyten

Die CaT lag aktiviert vor. Nagarse war in Puffer II gelöst und wurde in einer Konzentration von  $4 \times 10^{-2}$  mg/ml eingesetzt. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die bei 0 Minuten (entsprechend 2-5 Sekunden Proteolyse) angegebene spezifische Aktivität von  $4.970 \mu\text{mol/min/mg Protein}$  (= 100 %) bezogen.

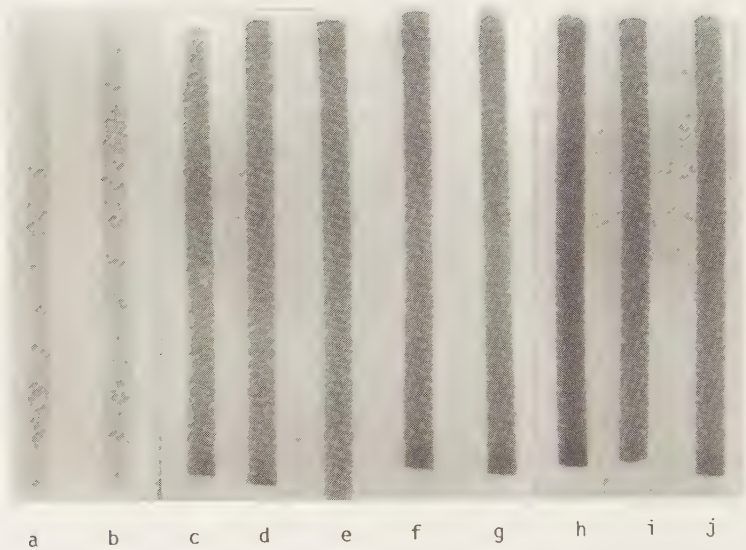


Abb. 27: Gelelektropherogramme der proteolytischen Spaltung der CaT der Humanerythrocyten mit Nagarse

Die Konzentration an Nagarse betrug  $4 \times 10^{-2}$  mg/ml. Die Versuche wurden bei  $30^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Proteolysezeiten wurden zwischen 2-5 Sekunden und 30 Minuten variiert. Nach der entsprechenden Proteolysezeit wurde die Reaktion mit dem doppelten Volumen des Reaktionsansatzes an 1 mol/l TCA abgestoppt. Je Gel wurden ca.  $80\text{ }\mu\text{g}$  CaT-Protein und  $10\text{ }\mu\text{g}$  Nagarse aufgetragen.

Proteolysezeiten:

a. 2-5 Sekunden; b. 1 Minute; c. 2 Minuten; d. 3 Minuten; e. 5 Minuten; f. 10 Minuten; g. 15 Minuten; h. 20 Minuten; i. 25 Minuten; j. 30 Minuten Zur weiteren Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7.

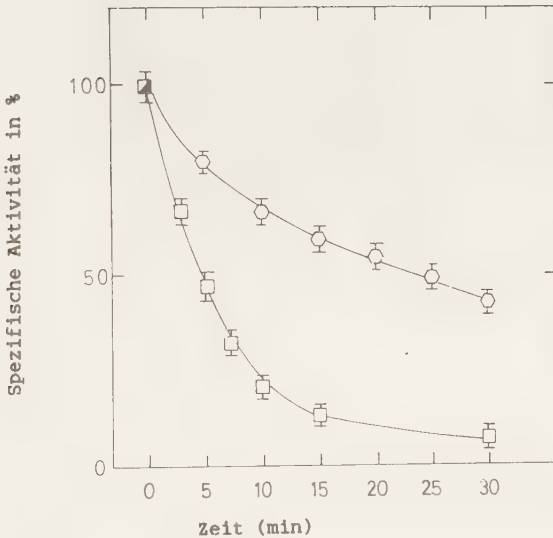


Abb. 28: Ergebnis verschieden langer Einwirkzeiten der Protease Ficin auf die Aktivität der CaT der Human-erythrocyten

Die CaT lag aktiviert vor. Ficin war in Puffer II gelöst und wurde in den Konzentrationen 1 mg/ml Enzym (  $\circ$  ) und 4 mg/ml Enzym (  $\square$  ) eingesetzt. Nach Zugabe der Ansatzlösung und einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die verbliebene Aktivität (wie unter III/2.8 beschrieben) bestimmt. Die Werte wurden auf die bei 0 Minuten (entsprechend 2-5 Sekunden Proteolyse) gemessene spezifische Aktivität von  $5.922 \mu\text{mol/min/mg Protein}$  (1 mg Ficin/ml Enzym) bzw.  $5.014 \mu\text{mol/min/mg Protein}$  (4 mg Ficin/ml Enzym) (=100 %) bezogen.

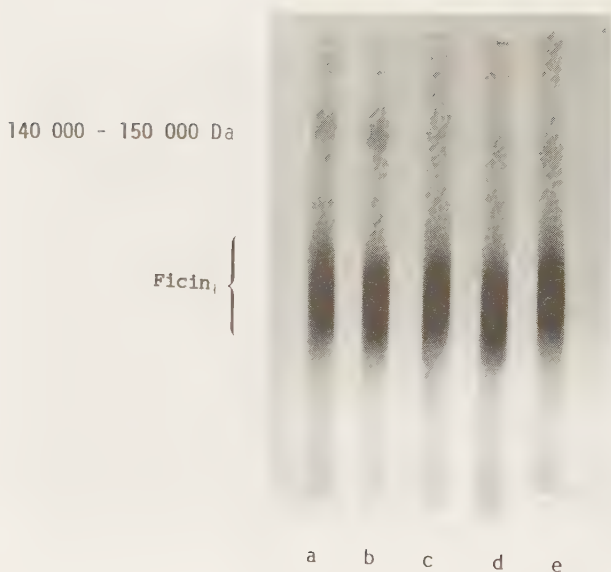


Abb. 29: Gelelektropherogramme der proteolytischen Spaltung der CaT der Humanerythrocyten mit Ficin

Die Konzentration an Ficin betrug immer 1 mg/ml, die Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Proteolysezeiten wurden zwischen 2-5 Sekunden und 20 Minuten variiert. Nach der entsprechenden Proteolysezeit wurde die Reaktion mit dem doppelten Volumen des Reaktionsansatzes an 1 mol/l TCA abgestoppt. Je Gel wurden ca. 80 µg CaT-Protein und 0,25 mg Ficin aufgetragen.

Proteolysezeiten:

a. 2-5 Sekunden; b. 5 Minuten; c. 10 Minuten; d. 15 Minuten; e. 20 Minuten. Zur weiteren Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7.

140 000 - 150 000 Da

Ficin

a b c d e

Abb. 30: Gelelektropherogramme der proteolytischen Spaltung der CaT der Humanerythrocyten mit Ficin

Die Konzentration an Ficin betrug immer 4 mg/ml. Die Versuche wurden bei 30 °C durchgeführt. Die Proteolysezeiten wurden zwischen 2-5 Sekunden und 60 Minuten variiert. Nach der entsprechenden Proteolysezeit wurde die Reaktion mit dem doppelten Volumen des Reaktionsansatzes an 1 mol/l TCA abgestoppt. Je Gel wurden ca. 80 µg CaT-Protein und 1 mg Ficin aufgetragen.

Proteolysezeiten:

a. 2-5 Sekunden; b. 15 Minuten; c. 30 Minuten; d. 45 Minuten; e. 60 Minuten. Zur weiteren Ausführung der Gelelektrophorese, vergleiche III/2.7.

IV

DISKUSSION

Über die CaT der Humanerythrocyten nach proteolytischer Spaltung mit Trypsin liegen mehrere Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen vor (ENYEDI et al., 1980; STIEGER & SCHATZMANN, 1981; CARAFOLI & ZURINI, 1982; CARAFOLI et al., 1982).

In dieser Arbeit wurden neben Trypsin zur Spaltung der CaT  $\alpha$ -Chymotrypsin, Thermolysin, Papain, Nagarse und Ficin eingesetzt. Bei den verwendeten Enzymen handelt es sich ebenfalls um Endoproteasen mit einer unterschiedlich hohen Spezifität hinsichtlich der spaltbaren Aminosäurebindungen und einem pH-Optimum zwischen 6.0 und 8.0. Die Spaltung der CaT durch Trypsin diente nur als Vergleich zu den oben genannten eingesetzten Proteasen und zu bereits vorliegenden Ergebnissen.

Die CaT wurde mit Trypsin im nicht aktivierten, d.h. calmodulinfreien Zustand gespalten (im Bereich von  $2 \times 10^{-3}$  bis  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml Enzym), die Reaktion wurde dann mit Trypsininhibitor abgestoppt und 10 U Calmodulin mit der Ansatzlösung zugesetzt (s. Abb. 5). Außerdem wurde die Spaltung der CaT mit Trypsin in aktiviertem Zustand (CaM gesättigt und optimale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration) im Bereich zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-1}$  mg/ml Enzym durchgeführt, wobei die Reaktion ebenfalls mit Trypsininhibitor abgestoppt wurde. Von CARAFOLI et al. (1982) wird für die nicht aktivierte CaT beschrieben, daß bei niedriger Trypsinkonzentration und anschließender CaM-Gabe, durch CaM noch die maximale Enzymaktivität der CaT erreicht werden kann. Dies konnten wir allerdings nicht bestätigen (s. Abb. 5), da der Kurvenverlauf der verbliebenen Aktivität trotz Zugabe von CaM dem Kurvenverlauf entsprach, der von STIEGER und SCHATZMANN (1981) nach Trypsinspaltung für das nicht aktivierte Enzym gefunden wurde. Eine

Trypsinspaltung der CaT ohne Zugabe von CaM nach Beenden der Proteolyse mit Trypsininhibitor wurde nicht durchgeführt. Die nicht proteolytisch angedaute CaT war aber durch 10 U CaM voll aktivierbar (s. Abb. 5). Eine mögliche Erklärung, daß durch die CaM-Gabe keine Aktivierung der mit Trypsin angedauten CaT in den eigenen Versuchen erreicht werden konnte, ist zum Beispiel, daß die CaM-Bindungsstelle am Enzym schon abgespalten bzw. verändert war, bedingt durch unterschiedliche Proteasekonzentrationen und längere Proteolysezeiten im Vergleich zu den Arbeiten von CARAFOLI et al. (1982).

Die Ergebnisse des im aktivierten Zustand vorliegenden CaT, das heißt mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und CaM gesättigt (s. Abb. 6), sind identisch mit den Untersuchungen von STIEGER & SCHATZMANN (1981).

Der Aktivitätsverlust für die beiden mit Trypsin gespaltenen Zustände lag in verschiedenen Bereichen. Beim nicht aktivierten Enzymzustand, d.h. calmodulin-freien, zwischen  $2 \times 10^{-1}$  und  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml Enzym (Abb. 5); beim aktivierten Enzymzustand, d.h. mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und CaM aktiviert zwischen  $10^{-2}$  bis  $10^{-1}$  mg/ml Enzym (Abb. 6). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Werte ist, daß  $\text{Ca}^{2+}$  und CaM die proteolytische Spaltung durch Trypsin potenzieren, da signifikant geringere Proteasekonzentrationen nötig sind, um dieselbe Aktivität zu erreichen.

Im Gelelektropherogramm ergab der proteolytische Abbau der mit CaM aktivierten CaT das von CARAFOLI et al. (1982) beschriebene Bild: Eine Auftrennung der Bande bei 140 000 bis 150 000 Dalton in Peptide mit Molekulargewichten von ca. 120 000 bis 130 000, 100 000, 90 000 und 68 000 Dalton (s. Abb. 18) bei einer Konzentration von  $3 \times 10^{-3}$  mg/ml Enzym. Ab einer Konzentration von  $7 \times 10^{-3}$  mg/ml Enzym folgt das Verschwinden der Bande bei 90 000 Dalton (s. Abb. 17),

aber es bleiben weiterhin die Banden bei ca. 115 000 bis 125 000 Dalton und 65 000 bis 70 000 Dalton bestehen. Der Vergleich zwischen den Peptiden im Gelelektropherogramm (Abb. 17 und 18) und der konzentrationsabhängigen Proteolyse (Abb. 6) der mit CaM aktivierten CaT ergibt bei der niedrigen Konzentration von  $3 \times 10^{-3}$  mg/ml Enzym neben der vollen Aktivität auch noch die Bande bei 90 000 Dalton, die nach CARAFOLI et al. (1982) die CaM-Bindungsstelle trägt. Mit dem Verschwinden dieser Bande kommt es dann allmählich zu einem Abfall der Aktivität. Dies steht im Gegensatz zur Spaltung des in nicht aktiviertem Zustand vorliegenden Enzyms (s. Abb. 5), bei dem der Abfall abrupt erfolgt. Weiterhin kommt es beim CaM-aktivierten Enzym zu einer Verbreiterung der Bande zu 65 000 bis 70 000 Dalton (s. Abb. 18). Bei der Proteolyse mit noch höherer Konzentration erfolgt die Spaltung der Bande bei 115 000 bis 125 000 Dalton, gefolgt von einem vollständigen Verlust der Aktivität zwischen  $10^{-2}$  und  $10^0$  mg/ml Enzym (s. Abb. 6 und 18). Da nach der Proteolyse der nicht aktivierten CaT durch CaM keine Aktivierung mehr erzielt werden konnte, ist anzunehmen, daß die CaM-Bindungsstelle am Enzym bereits gespalten wurde oder sterisch verändert war. So läßt sich auch der rasche Abfall (s. Abb. 5) der Aktivität im Bereich zwischen  $2 \times 10^{-1}$  und  $5 \times 10^{-1}$  mg/ml Enzym erklären, nämlich mit der Spaltung des Peptids mit einem Molekulargewicht von 115 000 bis 120 000 Dalton, das auch ohne Zusatz von CaM die volle Aktivität zeigt.

An der ebenfalls mit CaM aktivierten zyklischen GMP-Phosphodiesterase aus Rattenleber konnte bei der Proteolyse mit ✓-Chymotrypsin auch ein aktivierender Effekt nachgewiesen werden (MOSS et al., 1978). Dieser entsprach dem durch CaM und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und zwar bis zum Faktor 10. Diese Aktivierung ist zeit- und konzentrationsabhängig und läßt sich durch CaM nicht mehr

beeinflussen. Einen ähnlichen Effekt für CaM-freie Erythrocytenmembranen beschreiben TAVERNA & HANAHAN (1980). In den eigenen Versuchen ergaben sich bei Chymotrypsinkonzentrationen zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-1}$  mg

$\Delta$ -Chymotrypsin/ml Enzym konstante bzw. leicht ansteigende Meßwerte (s. Abb. 7); wobei der Wert des nicht gespaltenen Enzyms (=100 %) hier nicht erreicht wird. Zwischen  $4 \times 10^0$  und  $10^1$  mg  $\Delta$ -Chymotrypsin / ml Enzym kommt es dann zu einem Aktivitätsverlust, der auch bei der Proteolyse mit Trypsin gefunden wurde (vgl. Abb. 5 und 6 mit Abb. 7). Es könnte sich auch hier, wie auch für Trypsin beschrieben, um die Abspaltung eines Peptids handeln, das noch Restaktivität zeigt und ATP spaltet. Eine Aktivierung der CaT mit  $\Delta$ -Chymotrypsin entsprechend dem Trypsin erscheint nicht unwahrscheinlich, da beide Proteasen in ihrer physiologischen Wirkung ähnlich sind, ihre Spezifität allerdings unterschiedlich ist (vgl. Tab. 2). Eine Aktivierung konnte auch mit einer konzentrationsgleichen, zeitabhängigen Proteolyse (3 - 30 Minuten) bei mittleren Proteasenkonzentrationen, 1 mg und 6 mg Protease / ml Enzym gezeigt werden (s. Abb. 19). Nach 12 Minuten Einwirkdauer von  $\Delta$ -Chymotrypsin ergeben sich höhere Meßwerte als bei kürzerer Einwirkdauer, die dann bei Verlängerung der Proteolyse wieder abfallen. Zum Vergleich wurde diese Messung auch mit Puffer II (= Endkonzentration des Meßmediums) als Lösungsmittel durchgeführt (s. Abb. 20). Zunächst erfolgt ein starker Aktivitätsabfall bis 15 Minuten, dann kommt es zu einem konstanten Aktivitätsanstieg, möglicherweise bedingt durch Selbstverdauung der Protease (WESTHEIMER, 1980). Eine weitere mögliche Erklärung für diesen Anstieg wäre, daß es nach der proteolytischen Spaltung zu einer CaM-unabhängigen Aktivierung kommt und zusätzlich zu einer Verschiebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität. Eine Aktivierung wie beim nicht gespaltenen Enzym mit

optimaler Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und CaM kann dadurch aber nicht mehr erreicht werden. Ein ähnlicher Effekt wird nämlich auch bei der  $\text{NAD}^+$ -Kinase nach Trypsinspaltung beschrieben (MEIJER & GUERRIER, 1982). Ein aktivierender Einfluß durch  $\alpha$ -Chymotrypsin auf die GMP-Phosphodiesterase, ähnlich dem des CaM wird von MOSS et al. (1978) beschrieben, wie auch für die CaT mit Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin (TAVERNA & HANAHAN, 1980). Eine Änderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarfs der CaT nach Spaltung mit Trypsin konnten STIEGER und SCHATZMANN (1981) nachweisen. Im Gelelektropherogramm zeigt sich bei einer Konzentration von 4 mg  $\alpha$ -Chymotrypsin / ml Enzym eine Verbreiterung der Bande bei 140 000 Dalton (s. Abb. 21).

Durch eine proteolytische Spaltung mit Thermolysin konnte keine weitere Aktivierung der CaT erreicht werden (s. Abb. 8) wie mit Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin. Der Abfall der Aktivität des Kontroll- und 3-Minutenwertes verläuft kontinuierlich im Bereich  $>10^{-2}$  mg/ml Enzym. Im Bereich  $<10^{-2}$  mg/ml Enzym kommt es zu einer Annäherung der gemessenen Werte, die schließlich den Wert des nicht gespaltenen Enzyms erreichen. Auch bei einer konzentrationsgleichen, zeitabhängigen Proteolyse (s. Abb. 22) ergab sich ein stetiger Abbau des Enzyms, ohne daß Peptide von größerem Molekulargewicht gefunden werden konnten. MATSUBARA (1966) beschreibt für Thermolysin einen sehr guten proteolytischen Effekt, wenn an der zu spaltenden Peptidbrücke keine freie Amino- bzw. Carboxylgruppe vorhanden ist. Aus der Aminosäureanalyse (s. II/1.3) ist ersichtlich, daß ein großer Teil der Aminosäuren, die in der CaT enthalten sind, sauren oder basischen Charakter haben, allerdings auch viele Peptidbrücken, die durch Thermolysin gespalten werden können. Da nach MATSUBARA (1966) auf oder vor einer spaltbaren Aminosäure eine saure oder basische stehen müßte, um eine Spaltung zu

verhindern, ist die Möglichkeit vieler spaltbarer Peptidbrücken im CaT-Molekül noch groß genug, um zu erklären, daß es zu einem stetigen Abbau ohne Abspaltung von spezifischen größeren Peptidbruchstücken kommt.

Bei Papain (gelöst in Puffer I) zeigte sich eine Aktivierung im Bereich zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-2}$  mg/ml Enzym (s. Abb. 9 und 10). Eine konzentrationsgleiche, zeitlich unterschiedliche Spaltung ergab sich auch bei niedrigen Konzentrationen ( $10^{-2}$  und  $10^{-1}$  mg/ml Enzym). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von SARKADI et al. (1980), die bei Verwendung desselben Puffers eine Aktivierung der CaT nach Spaltung mit Papain fanden, die der von CaM ähnlich ist. SARKADI et al. (1980) benutzten Inside-out-Vesikel der CaT. Sie konnten zeigen, daß bei Spaltung mit Papain der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen geförderte Einbau von CaM nachläßt. Es könnte sich hier um eine dem Trypsin ähnliche Spaltung der CaT handeln, da beide Proteasen bevorzugt die Aminosäure Arginin abspalten. Im Gelelektropherogramm geht das Verschwinden der Bande bei 140 000 Dalton mit einer Verbreiterung der Bande bei ca. 100 000 Dalton einher.

Bei Verwendung von Puffer II konnte keine Aktivierung des Enzyms nachgewiesen werden. Ob es nur am unterschiedlichen Ionenmedium liegt oder die zugesetzten Stabilisatoren zum Beispiel ME die Spaltung beeinflussen, muß hier offen bleiben. Über den Versuchszeitraum kam es zu einer stetigen Aktivitätsabnahme des Enzyms, wobei im niedrigen Konzentrationsbereich auch die Meßwerte bei 2-5 Sekunden und 3 Minuten dem des nicht gespaltenen Enzyms entsprechen (s. Abb. 11). Im Gelelektropherogramm zeigte sich aber bei Verwendung beider Puffer dasselbe Bild.

Bei Nagarse, einer unspezifischen Protease, kommt es zu einem zunehmenden Aktivitätsverlust der CaT, ohne daß es einen Anhaltspunkt für eine Aktivierung gibt

(s. Abb. 12). Im Gelelektropherogramm konnten auch bei Verwendung kleinster Mengen Nagarse keine Bruchstücke der CaT nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß die Proteolyse trotz Zugabe von TCA zum Abstoppen der Reaktion weiterlief, oder aber nach Lösen in der 1 %igen SDS-Lösung vor dem Auftragen auf die Gele, da Nagarse in einer 1 %igen SDS-Lösung stabil ist (ALLEN, 1981).

Ficin, in Puffer II gelöst, bewirkt auch einen kontinuierlichen Abfall der CaT (s. Abb. 13), ohne je eine Aktivierung zu zeigen. Auch bei Verwendung niedrigerer Konzentrationen wurde der Wert des nicht gespaltenen Enzyms niemals erreicht. Hier könnte es sich um einen direkten Einfluß des DTT am Molekül der CaT handeln (vgl. Abb. 3). Im Gelelektropherogramm zeigt sich für 1 mg und 6 mg Ficin /ml Enzym ein konstanter Abbau der Bande bei 140 000 Dalton ohne Auftreten größerer Bruchstücke (s. Abb. 29 und 30). Bei der konzentrationsgleichen, zeitabhängigen Proteolyse ergibt sich das gleiche Bild, nämlich ein konstanter Verlust der Aktivität (s. Abb. 28). Ohne Zusatz von DTT zum Lösungspuffer scheint der Abbau der Bande bei 140 000 Dalton noch wesentlich schneller vor sich zu gehen.

Durch Zugabe von Calmodulin konnte bei keinem der durchgeführten Versuche eine signifikante Aktivierung der CaT nach Einwirken der eingesetzten Proteasen erreicht werden (s. Abb. 8, 11, 12 und 13). Die gemessenen Werte entsprechen außer bei Ficin, wo ein leichter Aktivitätsanstieg erfolgte, denen des bei 3 Minuten gemessenen Wertes. Um auszuschließen, daß CaM durch die Proteasen gespalten wurde und daher keine aktivierende Wirkung mehr hatte, wurde die Inkubationszeit um 10 Minuten verlängert und 10 U CaM an unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt. Da auch hier durch CaM keine Aktivitätssteigerung von CaT erreicht werden konnte (s. Abb. 14) ist anzunehmen, daß die für die CaM-Bindung nötige Bindungsstelle am Enzym verän-

dert worden ist. Mit den letztgenannten Versuchen hätte sich, sofern CaM noch aktivieren hätte können, ein Anstieg der Aktivität zeigen müssen, da KUZNICKI (1981) nachwies, daß die durch Trypsin gespaltenen Bruchstücke des CaMs auch noch ähnlich aktivieren können.

Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Papain erhöhen konzentrations- und zeitabhängig durch proteolytische Spaltung die Aktivität der CaT. Dieselbe Wirkung konnten wir durch Thermolysin, Nagarse und Ficin nicht nachweisen. Wahrscheinlich spielt die geringe Spezifität der letztgenannten Proteasen eine nicht unbedeutende Rolle. Da CaM-Gabe nach erfolgter proteolytischer Spaltung die Aktivität der CaT bei keiner der verwendeten Proteasen signifikant steigern konnte, ist anzunehmen, daß die CaM-Bindungsstelle abgespalten wird oder auch durch sterische Konformationsänderung des CaT-Moleküls maskiert wird.

Die proteolytische Spaltung der CaT sollte in dieser Hinsicht noch eingehender untersucht werden, da ein wichtiges Krankheitsbild unserer Zeit, die essentielle Hypertonie besser verstanden und therapiert werden könnte. In den letzten Jahren wurde von einigen Forschergruppen auf den erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Erythrocyten bei Hypertonikern hingewiesen. Die Ursache könnte unter anderem in einem Defekt der CaT liegen. Weiterführende Folgerungen wären spekulativ, doch sollte die CaT in dieser Hinsicht noch ausführlicher charakterisiert werden.

V

ZUSAMMENFASSUNG

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase der Humanerythrocyten wurde, nachdem sie gelchromatografisch rein hergestellt worden war (s. Abb. 15) und mit optimaler Konzentration an Calmodulin (CaM) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in aktiver Form vorlag, mit einigen Proteasen (Trypsin, *L*-Chymotrypsin, Papain, Thermolysin, Nagarse und Ficin) gespalten. Es wurde die verbliebene Aktivität nach proteolytischer Spaltung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Protease bei einer Proteolysedauer von 3 Minuten bestimmt, desgleichen die verbliebene Aktivität bei gleicher Konzentration an Proteasen, aber verschieden langer Einwirkzeit.

Die Messung der verbliebenen Aktivität wurde nach der Methode von ARNOLD et al. (1976) photometrisch über eine Farbkomplexbildung des freiwerdenden anorganischen Phosphats bestimmt. Die dabei entstandenen Peptide wurden mit SDS-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Coomassie-Blue hinsichtlich Molekulargewicht bzw. Abbauprodukten beurteilt. Nach proteolytischer Spaltung wurde gemeinsam mit der Ansatzlösung (= Meßmedium) zu jeder Messung bei der konzentrationsabhängigen, zeitgleichen Proteolyse 10 U CaM zugegeben und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten die verbliebene Aktivität bestimmt.

Mit Trypsin konnten die bekannten Ergebnisse einer Aktivierung des nicht mit CaM aktivierten Enzyms bestätigt werden, ebenso wie der proteolytische Abbau in ganz spezifische Peptide mit bestimmten Molekulargewichten, letzteres gelang auch mit der durch CaM aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase. *L*-Chymotrypsin zeigte ebenfalls eine leichte Aktivierung bei niedriger Konzentration und verschieden langer Einwirkzeit. Im Gelelektropherogramm zeigte sich allerdings nur eine

Auflockerung der Bande bei 140 000 Dalton ohne einen spezifischen Hinweis für die gefundene Aktivierung zu geben.

Mit Papain konnte ebenfalls eine Aktivierung bei bestimmten Konzentrationen und unterschiedlicher Einwirkdauer festgestellt werden, wobei hier auch im Gelelektropherogramm eine Bande bei 100 000 Dalton entstand, das für die Aktivierung - ähnlich dem Peptid nach Trypsinspaltung - verantwortlich sein könnte.

Mit den übrigen drei Proteasen Thermolysin, Nagarse und Ficin wurde die CaT, abhängig von der Konzentration und der Zeit kontinuierlich gespalten, ohne daß eine Aktivierung oder ein gehäuftes Auftreten bestimmter Peptide im Gelelektropherogramm sichtbar wurde.

Eine Aktivierung durch 10 U Calmodulin konnte bei keiner der Proteasen eindeutig nachgewiesen werden. Die gemessenen Werte entsprachen jeweils denen, die ohne Zusatz von CaM gemessen wurden.

Da CaM-Gabe nach erfolgter proteolytischer Spaltung die Aktivität der CaT nicht steigern konnte, ist anzunehmen, daß die CaM-Bindungsstelle abgespalten oder durch Konformationsänderung maskiert wird, so daß CaM am CaT-Molekül nicht angreifen kann.

PROPERTIES OF THE  $\text{Ca}^{2+}$ -TRANSPORT-ATPASE OF HUMAN ERYTHROCYTES  
AFTER SPECIFIC CLEAVAGE WITH SOME PROTEASES

SUMMARY

The  $\text{Ca}^{2+}$ -transport-ATPase (CaT) was used highly purified, showing one band in a gel electropherogram (Abb. 15). The proteolytic cleavage of the CaT was done in its active form, with the optimal concentration of calmodulin (CaM) and  $\text{Ca}^{2+}$ -ions. Proteases used were trypsin,  $\Delta$ -chymotrypsin, papain, thermolysin, nagarse and ficin. The activity remaining after proteolytic cleavage was determined with varying concentrations of protease and a proteolytic time of 3 minutes, and with constant concentrations of protease and varying proteolytic time.

The determination of the remaining activity was done according to ARNOLD et al. (1976). In this method the inorganic phosphate was determined colorometrically. The produced peptides were classified according to their molecular weight by SDS-gel electrophoresis and coloring of Coomassie-Blue. After each proteolytic cleavage with varying concentrations of protease and constant time, a measurement was done by giving 10 U of CaM in addition and determining the remaining activity.

Trypsin, used as protease, confirmed results reported previously of an activation of CaT not activated with CaM as well as a specific cleavage to peptides of known molecular weights. The cleavage to specific peptides by CaM activated CaT was also demonstrated.

$\Delta$ -chymotrypsin showed slight activation combined with low concentrations of protease and varying times; the gel electropherogram showed only increased width of the band with 140 000 Dalton.

Papain activated the CaT with specific concentrations and varying times; in the gel electropherogram an additional band at 100 000 Dalton was found which could be responsible, similar to a peptide after tryptic cleavage, for this activation.

The proteases thermolysin, nagarse and ficin did not activate the CaT using varying concentrations and times. The gel electropherogram showed a constant loss of the band at 140 000 Dalton not showing a band with higher molecular weight.

Activation of the CaT by 10 U CaM could not be proven in any of the proteases. The determined values were the same found without an additional CaM.

Because additional CaM after proteolytic cleavage did not elevate the activation of the CaT, it was concluded that the binding-place for CaM at the CaT molecule was cleaved off or changed by the structure of the molecule. Therefore the CaM could not interfere with the CaT molecule.

VI

LITERATURVERZEICHNIS

Allen, G.

Specific cleavage of the proteins. Enzymic cleavage of denaturated polypeptids.

In: Work T. S., Burdon R. H. (eds)

Sequencing of Proteins and Peptids

Elsevier North Holland Biomed. Pr., Amsterdam, 43-71, 1981

Andersson, A., Forsén, S., Thulin, E., Vogel, H. J.

Cadmium-113 nuclear magnetic resonance studies of proteolytic fragments of Calmodulin: A Stigument of strong and weak cation binding sites.

Biochemistry 22, 2309-2313, 1983

Andreasen, T. J., Keller, C. H., LaPorta, D. C.,

Edelmann, A. M., Storm, D. R.

Preparation of azido-calmodulin: A photoaffinity-label for calmodulin-binding proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2782-2785, 1981

Arnold, A., Wolf, H. U., Ackermann, B. P., Bader, H.

An automated continuous assay of membrane-bound and soluble ATPase and related enzymes.

Anal. Biochem. 71, 209-213, 1976

Arnon, R.

Papain

In: Colowick S. P., Kaplan N. O. (chief-eds), Perman  
G. E., Lorand L. (eds)

Methods in Enzymology XIX Proteolytic Enzymes.

Academic Press New York/London, 226-244, 1970

Bababunmi, E. A., Emeh, J. K., Bolaij, O. M.  
( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-ATPase of trypanosomes.

Annals N. Y. Acad. Sci. 402, 433-437, 1982

Bürkler, J., Solioz, M.

The ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  pumping systems of  
*Streptococcus faecium*.

Annals N. Y. Acad. Sci. 402, 422-432, 1982

Carafoli, E., Zurini, M.

The  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of plasma membranes.  
Purification reconstitution and properties.

Biochem. Biophys. Acta 683, 279-301, 1982

Carafoli, E., Zurini, M., Niggli, V., Krebs, J.

The  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ATPase of erythrocytes.

Annals N. Y. Acad. Sci. 402, 304-328, 1982

Charbonneau, H., Cormier, M. J.

Purification of plant Calmodulin by  
fluphenazine-sepharose affinity chromatography.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 90, 1039-1047, 1979

Cheung, W. Y.

Cyclic 3',5'-Phosphodiesterase.

J. Biol. Chem. 246, 2859-2869, 1971

Cheung, W. Y.

Calmodulin.

Scientific Amer., 246, Band 6, 48-56, 1982

Cohen, P.

The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylasekinase and the molecular basis of its activation reactions.

Europ. J. Biochem. 34, 1-14, 1973

Dunham, P. T., Glynn, I. M.

Adenosintriphosphatase activity and the active moments of the alkali metal ions.

J. Physiol. 156, 274-293, 1961

Enyedi, A., Sarkadi, B., Szász, J., Bot, G., Gárdos, G.  
Molecular properties of the red cell calcium pump.

II. Effects of calmodulin, proteolytic digestion and drugs on the calcium induced membrane phosphorylation by ATP in inside-out red cell membrane vesicles.

Cell Calcium 1, 229-310, 1980

Fairbanks, G., Steck, T. L., Wallach, D. F. H.

Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membranes.

Biochemistry 10, 2606-2617, 1971

Fiske, S. H., Subbarow, Y.

The colorimetric determination of phosphorus

J. Biol. Chem. 66, 375-400, 1925

Garrahan, P. J., Rega, A. F.

Activation of partial reactions of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase  
from human red cells by  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP.

Biochem. Biophys. Acta 513, 59-65, 1978

Gietzen, K., Tejčka, M., Wolf, H. U.

Calmodulin affinity chromatography yields a functional  
purified erythrocyte ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-dependent  
adenosine-triphosphatase.

Biochem. J. 189, 81-88, 1980

Gietzen, K.

Untersuchungen zur Isolierung und Rekonstitution der  
 $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase der Humanerythrocyten.

Rer. biol. hum. Diss., 1980, Ulm

Gietzen, K., Konrad, R., Tejčka, M., Fleischer, S.,  
Wolf, H. U.

Purification, characterization, and reconstitution of  
the human erythrocyte membrane.

Acta Biol. Med. Germ. 40, 443-456, 1981

Gietzen, K., Kolandt, J.

Large scale isolation of human erythrocytes  
 $\text{Ca}^{2+}$ -transport-ATPase.

Biochem. J. 207, 155-159, 1982

Gopinath, R. M., Vincenzi, F. M.

Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of  $(Ca^{2+} - Mg^{2+})$ -ATPase.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 1203-1209, 1977

Graf, E., Verma, A. K., Gorski, J. K., Lopaschuk, G., Niggli, V., Zurini, M., Carafoli, E., Penniston, J. T.  
Molecular properties of calcium-pumping ATPase from human erythrocytes.

Biochemistry 21, 4511-4516, 1982

Jarret, H. W., Penniston, J. T.

Partial purification of the  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  ATPase activator from human erythrocytes: Its similarity to the activator of 3':5-cyclic nucleotide phosphodiesterase.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 1210-1216, 1977

Jarret, H. W., Penniston, J. T.

Purification of the  $Ca^{2+}$ -stimulated ATPase activator from human erythrocytes. Its membership in the class of  $Ca^{2+}$ -binding modulator proteins.

J. Biol. Chem. 253, 4676-4682, 1978

Kakiuchi, S., Sobue, K., Yamazaki, R., Kambayashi, J., Sakon, M., Kosaki, G.

Lack of tissue specificity of calmodulin: a rapid and high-yield purification method.

FEBS Lett. 126, 203-207, 1981

Karlson, P.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und  
Naturwissenschaftler.

9. Auflage, 135-139

Thieme / Stuttgart 1974

Kaspar, C. B.

Fragmentation of Proteins for Sequence Studies and  
Separation of Peptide Mixture.

In: Needleman S. B. (ed) Molekular Biology

Biochemistry and Biophysics / Protein Sequence

Determination. A Source Book of Methods and

Techniques; Springer Verlag, Berlin - Heidelberg -

New York, Band 8, 114-158, 1975

Kilhoffer, M. C., Haiech, J., Demaille, J. G.

Ion binding of calmodulin.

Mol. Cell. Biochem. 51, 33-54, 1983

Klee, C. B., Crouch, T. H., Richman, R. G.

Calmodulin.

Ann. Rev. Biochem. 49, 489-515, 1980

Klee, C. B.

Calmodulin: structure-function relationship.

In: Cheung W. Y. (ed) Calcium and cell functions.

Academic Press Band I CH4, New York, 559-577, 1980

Klip, A., Reithmeier, R. A. F., MacLennan, D. H.  
Alignment of the major tryptic fragments of the  
adenosine triphosphatase from sarcoplasmatic reticulum.  
J. Biol. Chem. 255, 6562-6568, 1980

Knauf, P. A., Proverbio, F., Hoffmann, J. F.  
Chemical characterization and pronase susceptibility  
of the Na:K pump associated phosphoprotein of human  
red blood cells.  
J. Gen. Physiol. 63, 305-323, 1974

Knauf, P. A., Proverbio, F., Hoffmann, J. F.  
Electrophoretic separation of different  
phosphoproteins associated with the Ca-ATPase and  
Na<sup>-</sup>, K<sup>-</sup>, ATPase in human red cell ghosts.  
J. Gen. Physiol. 63, 324-336, 1974

Kohse, K. P., Heilmeyer, L. M. jr.  
The effect of Mg<sup>2+</sup> on the Ca<sup>2+</sup>-binding properties  
and Ca<sup>2+</sup>-induced Tyrosine-fluorescence changes of  
Calmodulin isolated from rabbit skeletal muscle.  
Eur. J. Biochem. 117, 507- 513, 1981

Kuznicki, J., Grabarek, H., Brzeska, H., Drabikowski,  
W., Cohen, P.  
Stimulation of enzyme activities by fragments of  
calmodulin.  
FEBS Lett. 130, 141-145, 1981

Lacy, J.

Automatic procedures for the determination of calcium, potassium, magnesium, and phosphorus in soil extracts. Analyst 90, 65-75, 1965

Lichtner, R., Wolf, H. U.

Characterization of phosphorylated high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of human erythrocyte membranes.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmac: Suppl. 297/II, R 38 (p. 152), 1977

Liener, I. E., Friedenson, B.

Ficin

In: Colowick S. P., Kaplan N. O. (chief-eds), Perman G. E., Lorand L. (eds)

Methods in Enzymology XIX Proteolytic Enzymes.

Academic Press New York/London, 261-273, 1970

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Rendale, R. J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951

Luthra, M. G., Watts, R. P., Scherer, K. L., Kim, H. D.

Calmodulin - an activator of human erythrocytes ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )-ATPase phosphorylation.

Biochem. Biophys. Acta 663, 299-304, 1980

Lynch, T. T., Cheung, W. Y.  
Human erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase: Mechanism of  
stimulation by  $\text{Ca}^{2+}$ .

Arch. Biochem. Biophys. 194, 165-170, 1979

MacLennan, D. H., Khanna, V. K., Stewart, P. S.  
Restoration of calcium transport in the trypsin  
treated  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  dependent adenosine triphospha-  
tase of sarcoplasmatic reticulum exposed to sodium  
dodecyl sulfat.

J. Biol. Chem. 251, 7271-7274, 1976

Loewenstein, W. R., Rose, B.  
Calcium in (junctional) intracellular communication  
and a thought on its behaviour in intracellular  
communication.

Annals. N. Y. Acad. Sci. 307, 285-307, 1978

Matsubara, H.  
Observations on the specificity of thermolysin with  
synthetic peptids.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 427-430, 1966

Matsubara, H.  
Purification and assay of Thermolysin  
In: Colowick S. P., Kaplan N. O. (chief-eds), Perman  
G. E., Lorand L. (eds)  
Methods in Enzymology XIX Proteolytic Enzymes.  
Academic Press New York/London, 642-651, 1970

Means, A. R., Dedman, J. R.

Calmodulin - an intracellular calcium receptor.

Nature 285, 73-77, 1980

Meijer, L., Guerrier, P.

Activation of calmodulin dependent  $\text{NAD}^+$  kinase by trypsin.

Biochem. Biophys. Acta 702, 143-146, 1982

Michalek, M., Campbell, K. P., MacLennan, D. H.

Localisation of the high affinity calcium binding protein and an intrinsic glycoprotein in sarcoplasmatic reticulum membrane.

J. Biol. Chem. 255, 1317-1326, 1980

Moss, J., Manganiello, V. C., Vaughan, M.

Effects of chymotrypsin and a calcium dependent protein activator on guanosine 3',5'-monophosphat phosphodiesterase from rat liver.

Biochem. Biophys. Acta 541, 279-287, 1978

Niggli, V., Ronner, P., Carafoli, E., Penniston, J. T.

Effects of calmodulin on the  $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -ATPase partially purified from erythrocyte membranes.

Arch. Biochem. Biophys. 198, 124-130, 1969

Niggli, V., Penniston, J. T., Carafoli, E.

Purification of the  $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -ATPase of human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column.

J. Biol. Chem. 254, 9955-9958, 1979

Niggli, V., Adunyah, E. S., Carafoli, E.

Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids and limited proteolysis mimics the effect of calmodulin on the purified erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

J. Biol. Chem. 256, 8588-8592, 1981

Penniston, J. T.

Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase.

Annals N. Y. Acad. Sci. 402, 296-303, 1982

Ray, T. K., Sen, P. C.

Trypsination unmasks a  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase activity from purified pig gastric microsomes.

Life Science 28, 1969-1974, 1981

Rega, A. F., Garrahan, P. J.

Calcium ion-dependent phosphorylation of human erythrocyte membranes.

J. Membrane Biol. 22, 313-327, 1975

Rega, A. F., Garrahan, P. J., Barrabin, H.,

Horenstein, A., Rossi, P. J.

Reaction scheme for the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human red blood cells.

In: Mukohata, Y., Packer, L.

Cation flux Across Biomembranes.,

New York Acad. Press 67-76, 1979

Rega, A. T.

Round table discussions on the plasma membrane  
 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases: Introductory comments.

Annals N. Y. Acad. Sci. 402, 433-434, 1982

Ronner, P., Gazzotti, P., Carafoli, E.

A lipid requirement for the  $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})$ -activated  
ATPase of erythrocyte membranes.

Arch. Biochem. Biophys. 179, 578-583, 1977

Roufogalis, B. D.

Regulation of calcium translocation across the red  
blood cell membrane.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 57, 1331-1349, 1979

Roufogalis, B. D., Akyempon, C. K., Al Jobore, A.,  
Minocherhomje, A. M.

Regulation of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump of the erythrocyte  
membrane.

Annals N. Y. Acad. Sci. 402, 349-367, 1982

Ross, E., Schatz, G.

Assay of Protein in the Presence of High  
Concentrations of Sulfhydryl Compounds.

Anal. Biochem. 54, 304-306, 1973

Sarkadi, B., Enyedi, A., Gárdos, G.

Molecular properties of the red cell calcium pump

I. Effects of calmodulin, proteolytic digestion and drugs on the kinetics of active calcium uptake in inside-out red cell membrane vesicles.

Cell Calcium 1, 287-297, 1980

Sarkadi, B., Enyedi, A., Nyers, A., Gárdos, G.

The Function and Regulation of the calcium pump in the erythrocyte membrane.

In: Carafoli, E. and Scarpa, A., (eds.) Transport ATPases.

Annals of the New York Acad. of Sciences  
402, 329-348, 1982

Scharff, O., Foder, B.

Reversible shift between two states of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in human erythrocytes mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  and a membrane bound activator.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 509, 67-77, 1978

Schatzmann, H. J.

ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion from human red cells.

Experientia 22, 364-368, 1966

Schatzmann, H. J.

The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells.

In: Carafoli, E. (ed)

Membrane Transport of Calcium.

Acad. Press London, England, 41-108, 1981

Singleton, W. S., Gray, M. S., Brown, M. L., White, J. L.

Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids.

J. Amer. Oil Chem. Soc. 42, 53-56, 1965

Smyth, D. G.

Trypsin

In: Colowick S. P., Kaplan N. O., (chief-eds), Perman G. E., Lorand L. (eds)

Methods in Enzymology XIX Proteolytic Enzymes.

Academic Press New York/London, 214-231, 1970

Stieger, J., Schatzmann, H. J.

Metal requirement of the isolated red cell Ca pump ATPase after elimination of calmodulin dependence by trypsin attack.

Cell Calcium 2, 601-616, 1981

Tanaka, T., Naka, M., Hidaka, H.

Activation of Myosin light chain kinase by trypsin.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 92, 313-318, 1980

Taverna, R. D., Hanahan, D. J.

Modulation of human erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPase activity by phospholipase  $\text{A}_2$  and proteases. A comparison with calmodulin.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 94, 652-659, 1980

Vincenzi, F. F., Hinds, T. R.

Calmodulin and plasma membrane calcium pump.

Annals N. Y. Acad. Sci. 356, 232-243, 1981

Vincenzi, F. F.

Pharmacological modifications of the  $\text{Ca}^{2+}$  pump ATPase activity of human erythrocytes.

Annals N. Y. Acad. Sci. 402, 368-380, 1982

Watterson, D. M., Vanaman, T. C.

Affinity chromatography purification of a cyclic nucleotide phosphodiesterase using immobilized modulator protein, a troponin like protein from brain.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 73, 40-46, 1976

Weber, K., Osborne, M.

The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamid gel-electrophoresis.

J. Biol. Chem. 244, 4406-4412, 1969

Westheimer, F. H.

Photoaffinity labelling-retrospect and prospect.

Annals N. Y. Acad. Sci. 346, 134-143, 1980

Wetzker, R., Klinger, R., Cumme, G., Hoppe, S.,  
Fründer, H.

Activation of  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase of human erythrocytes by calmodulin liganded with three  $\text{Ca}^{2+}$ .

Biochem. Int. 4, 385-390, 1982

Wolf, H. U., Dieckvoss, G.

Inhibition of membrane-bound and solubilized  
high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of human erythrocytes by  
SH-reagents.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Suppl.  
293, R 43 (p. 169), 1976

Wolf, H. U., Dieckvoss, G., Lichtner, R.

Purification and properties of high affinity  
 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of human erythrocyte membranes.  
Acta. Biol. Med. Germ. 36, 847-858, 1977

Wolf, H. U., Knipser, W.

Properties of soluble high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from  
human erythrocyte membranes.  
Experimenta 31, 726, 1975

LEBENS LAUF

29. 9. 1952: Geboren in Goosholz, Krs. Schleswig als Tochter des Tierarztes Dr. Otto Haeger und seiner Frau Carla Haeger, geb. Thiesen
- 1958 - 1962: Besuch der Grundschule in München-Aubing
- 1962 - 1971: Besuch des Elsa-Brandström Mädchengymnasiums in München-Pasing
- Juni 1971: Abitur
- 1971 - 1973: Ausbildung zur Apothekerassistentin in der Ubo-Apotheke in München-Aubing mit Abschluß pharmazeutisches Vorexamen
- 1973 - 1979: Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München
- 1979: Staatsexamen
- 1979 - 1980: Tierarztvertretungen und Apothekenvertretungen
- Okt. 1980 - Aug. 1983 Assistentin in der Abt. Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm und Durchführung der Versuche der vorliegenden Doktorarbeit
- ab November 1983: Tierarzt auf dem Versuchsgut der Fa. MSD Sharp & Dohme GmbH, Lauterbach

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. U. Wolf für die Überlassung des Themas und seine vielfältige Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Bader für zahlreiche anregende Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Schmid möchte ich mich für das wohlwollende Interesse an dieser Arbeit und die wertvollen Hinweise herzlich bedanken.

Sehr bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. A. Krug für die fruchtbare Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Gestaltung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt des weiteren Frau K. Heise, die an der redaktionellen Gestaltung mitgearbeitet hat.









